



# Technische Universität München

Fakultät für Medizin

Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie

Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Prof. Dr. Rüdiger von Eisenhart-Rothe)

Biomechanische Analyse von Regeneratknorpel 12 Monate nach operativer Behandlung vollschichtiger Knorpeldefekte am Kniegelenk durch Mikrofrakturierung und Anbohrung im Schafsmodell

Michael Wittek

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfende der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Rainer Burgkart

2. Prof. Dr. Andreas Imhoff

Die Dissertation wurde am 08.06.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 20.02.2019 angenommen.

*Meiner Familie und im Besonderen meiner Oma Leni.*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Stand der Forschung</b> .....	<b>3</b>
2.1	Grundlagen der Knorpelstruktur und -biomechanik.....	3
2.1.1	Aufbau des hyalinen Knorpels.....	3
2.1.2	Funktionelle Biomechanik von Gelenkknorpel.....	8
2.2	Umschriebener Knorpeldefekt.....	15
2.2.1	Epidemiologie.....	15
2.2.2	Ätiologie.....	16
2.2.3	Klinische Präsentation.....	17
2.2.4	Diagnostik und Klassifikation.....	18
2.2.5	Stadiengerechte Therapie.....	21
2.3	Präklinische Studienlage.....	29
<b>3</b>	<b>Fragestellung</b> .....	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methodik</b> .....	<b>35</b>
4.1	Versuchsproben.....	35
4.1.1	Präklinisches Tiermodell.....	35
4.1.2	Behandlungsgruppen.....	36
4.1.3	Probengewinnung und Lagerung.....	39
4.2	Bestimmung der quantitativen Defektfüllung.....	39
4.3	Prüfung der biomechanischen Knorpel­eigenschaften.....	41
4.3.1	Mechanische Dickenmessung.....	42
4.3.2	Stufenweise Indentation.....	44
4.4	Statistische Analyse.....	47
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>48</b>
5.1	Makroskopische Beurteilung der Gewebep­roben.....	48
5.2	Ergebnisse der quantitativen Defektf­üllung.....	52
5.3	Ergebnisse der mechanischen Dicken­messung.....	53
5.4	Ergebnisse der stufenweisen Indenta­tion.....	54
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>58</b>
6.1	Präklinisches Tiermodell.....	58
6.2	Standardisierte Defektbehandlung.....	59

6.3	Makroskopische Beurteilung und quantitative Defektfüllung .....	60
6.4	Lokale Knorpeldicke .....	63
6.5	Elastizitätsmoduln und viskoelastisches Verhalten .....	64
6.6	Schlussfolgerungen.....	70
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>73</b>
<b>9</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>88</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>89</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>102</b>

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über die strukturelle Zusammensetzung von Gelenkknorpel (modifiziert nach Aigner 2003).....	4
Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Chondrozyten mit Darstellung von Nucleus (N), rauem endoplasmatischem Retikulum (rER) und Golgi-Apparaten (G) (modifiziert nach Archer und Francis-West 2003).....	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Kollagennetzwerks in Interaktion mit Proteoglykanen, die gebunden an Hyaluronsäure die Aggrekane bilden (modifiziert Mow et al. 1992).....	6
Abbildung 4: Zonale Schichtung des hyalinen Knorpels (modifiziert nach Mow et al. 1992).....	7
Abbildung 5: Längs- und Querdehnung eines Festkörpers der Länge $l$ und Breite $d$ vor (a) und nach (b) Einwirken der Kraft $F$ (Brinckmann et al. 2000)...	10
Abbildung 6: Typisches Spannungs-Dehnungs-Diagramm: die Steigung im linearen Bereich der Kurve ergibt den E-Modul (Brinckmann et al. 2000).....	11
Abbildung 7: Drei verschiedene Methoden zur Prüfung osteochondraler Proben: unconfined compression (a), confined compression mit porösem Prüfstempel (b) und Indentation (c) (modifiziert nach Hurschler und Abedian 2013).....	12
Abbildung 8: Weg-Zeit- bzw. Kraft-Zeit-Diagramme für den positionsgeregelten Stress-Relaxations-Versuch (a) und den kraftgeregelten Kriech-Versuch (b) (modifiziert nach Lu und Mow 2008).....	13
Abbildung 9: Das Netz eines axialsymmetrischen FE-Modells vor (a) und nach (b) Belastung mit einem zylindrischen Indentor (modifiziert nach Zhang et al. 1997).....	14
Abbildung 10: Die häufigsten Ursachen für Verletzungen des Gelenkknorpels bei erinnerlich vorangegangenen Trauma (modifiziert nach Årøen et al. 2004).....	16
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Schritte der Mikrofrakturierung (modifiziert nach Mithoefer et al. 2006): Debridement und Schaffung stabiler Knorpelränder (a), Kürettage der kalzifizierten Knorpelschicht (b), Mikrofrakturierung senkrecht zur Knochenoberfläche mittels 45°-Ahle (c), Bildung eines stabilen mesenchymalen Thrombus (d).....	23
Abbildung 12: Darstellung der wichtigsten Schritte der autologen matrix-induzierten Chondrogenese (modifiziert nach Gille et al. 2010): Mikrofrakturierung (a), Aufbringen des Fibrinklebers (b), Auflage der Kollagenmembran (c).....	24

Abbildung 13: Autologe osteochondrale Transplantation (modifiziert nach Steinwachs et al. 2014) .....	26
Abbildung 14: Therapiemöglichkeiten osteochondraler Defekte ICRS Grad III + IV in Abhängigkeit von der Beteiligung des subchondralen Knochens und der Defektgröße.....	27
Abbildung 15: Vergleich der prozentualen Löcherdichte bei Anwendung von knochenmarkstimulierenden Verfahren in verschiedenen präklinischen Studien geordnet nach den Autoren. In den Klammern sind die verwendeten Methoden angegeben. Abkürzungen: B = Bohrung, MF = Mikro-frakturierung, K = Kirschner-Draht. ....	31
Abbildung 16: Stanze zum Setzen von runden, vollschichtigen Knorpeldefekten mit Durchmesser 6 mm. Instrumente einzeln (a) und zusammengesetzt (b). ....	35
Abbildung 17: Individuell angefertigte Operationsinstrumente. Von oben nach unten: Führungshilfe für drei Löcher, Führungshilfe für sechs Löcher, Bohrer, Ahle für 4 mm tiefe Picks, Ahle für 2 mm tiefe Picks. ....	38
Abbildung 18: Detaillierte Darstellung der verschiedenen Behandlungsmethoden. Obere Reihe: Aufsicht auf die Führungshilfen mit 3 bzw. 6 Löchern, mittlere Reihe: Seitansicht der Führungshilfen mit senkrecht eingebrachten Ahlen und Bohrern, untere Reihe: schematische Darstellung eines Querschnitts durch den mikrofrakturierten Knorpeldefekt. Nativer Knorpel (a), subchondraler Knochen (b), Gewebe im eröffneten Knochen (c). ....	38
Abbildung 19: Schematische Darstellung der osteochondralen Probenstücke mit jeweils halbkreisförmigem Defektbereich.....	39
Abbildung 20: Aufnahmen bei Probenentnahme: Übersicht über die mediale Femurkondyle mit zwei teilweise gefüllten Knorpeldefekten (a), Vergrößerte Ansicht des anterioren Defektes mit deutlich sichtbaren Knorpelinseln (b). ....	40
Abbildung 21: Flächenbestimmung mit ImageJ: Manuelle Auswahl der ursprünglichen Defektgröße (a), Auswahl der nicht bedeckten Defektfläche mittels Schwellwert (b), geringe manuelle Optimierungen der Schwellwert-Auswahl (c).....	40
Abbildung 22: Ausschnitt aus der Messanleitung zur Bildanalyse mittels ImageJ .....	41
Abbildung 23: Hochdynamisches Prüfsystems mit Kraftaufnehmer (a), Probenkammer mit Einspannhilfe (b) und hochauflösendem Kamerasystem (c). Im Kamerabild werden der zylindrische Indenter (d) und die Knorpelprobe (e) vergrößert dargestellt.....	42
Abbildung 24: Schematische Darstellung der Knorpeldickenmessung an einer Probe nach Anbohrung des subchondralen Knochens. Nativer Knorpel (a), subchondraler Knochen (b), Gewebe im Bohrloch (c) und neugebildeter Regeneratknorpel (d). ....	43

- Abbildung 25: Aufnahmen einer mechanischen Knorpeldickenmessung: Senkrechte Ausrichtung des Prüfstempels ( $d = 0,8 \text{ mm}$ ) zur Probenoberfläche (a), Belastung des Knochens (b), horizontale Verschiebung der Probenkammer (c) und Anfahren des Knorpelregenerates (d). ..... 44
- Abbildung 26: Stufenweise Stress-Relaxation: Vorgegebener stufenförmiger Weg und gemessene resultierende Kraft im Zeitverlauf ..... 45
- Abbildung 27: Spannungs-Dehnungs-Diagramm der stufenweisen Indentation und Bestimmung des E-Moduls  $E_{measured} = 1,3146 \text{ MPa}$ . Die Regressionsgerade gilt für den Bereich von 6 - 40% Dehnung und besitzt in dieser Berechnung einen Korrelationskoeffizienten von  $R^2 = 0,9892$ . ..... 45
- Abbildung 28: Ausschnitt aus dem Stufenversuch (Schritte 6 – 10) mit Darstellung der Spitzenkräfte und Kräfte im Equilibrium bei 14%, 16% und 18% Dehnung ..... 47
- Abbildung 29: Fotografische Aufnahme einer Knorpelprobe der Gruppe B3x4 unter dem Auflichtmikroskop (TUM-Code: mif33). In der Ansicht von oben (a) ist der ursprüngliche Defektbereich durch den gestrichelten Halbkreis angedeutet. Umgebend ist der native Knorpel (N) zu sehen. In der Seitansicht mit Schnittführung durch die Defektmitte (b) sind eine typische Insel aus Regeneratknorpel (\*) und der subchondrale Knochen (SK) abgebildet. Der Pfeil markiert das aus dem umliegenden Knorpelbereich überhängende Gewebe ohne feste Verbindung zum subchondralen Knochen. .... 49
- Abbildung 30: Übersicht über die medialen Femurkondylen der unbehandelten Leerkontrollen nach 12 Monaten Standzeit. Beschriftung zur Probenidentifikation: (a) mif-06, (b) mif-04, (c) mif-01, (d) mif-05, (e) mif-03, (f) mif-02. .... 49
- Abbildung 31: Übersicht über die medialen Femurkondylen der Behandlungsgruppe M3x2 nach 12 Monaten Standzeit. Beschriftung zur Probenidentifikation: (a) mif-19, (b) mif-20, (c) mif-21, (d) mif-22, (e) mif-23, (f) mif-24. .... 50
- Abbildung 32: Übersicht über die medialen Femurkondylen der Behandlungsgruppe M3x4 nach 12 Monaten Standzeit. Beschriftung zur Probenidentifikation: (a) mif-12, (b) mif-13, (c) mif-15, (d) mif-16, (e) mif-17, (f) mif-18, (g) mif-31. .... 50
- Abbildung 33: Übersicht über die medialen Femurkondylen der Behandlungsgruppe B3x4 nach 12 Monaten Standzeit. Beschriftung zur Probenidentifikation: (a) mif-07, (b) mif-08, (c) mif-09, (d) mif-10, (e) mif-11, (f) mif-14, (g) mif-32, (h) mif-33. .... 51
- Abbildung 34: Übersicht über die medialen Femurkondylen der Behandlungsgruppe B6x4 nach 12 Monaten Standzeit. Beschriftung zur Probenidentifikation: (a) mif-25, (b) mif-26, (c) mif-27, (d) mif-28, (e) mif-29, (f) mif-30. .... 51
- Abbildung 35: Prozentuale Füllung der Knorpeldefekte ( $MW \pm SA$ ) in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe ..... 53

Abbildung 36: Vergleich der lokalen Knorpeldicke ( $MW \pm SA$ ) in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe.....	54
Abbildung 37: Vergleich der Elastizitätsmoduln ( $MW \pm SA$ ) in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe.....	56
Abbildung 38: Verhältnis der Spitzenkräfte zu den Kräften im Equilibrium ( $MW \pm SA$ ) in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe.....	57
Abbildung 39: Bilder von Kaninchen-Trochlea aus dem micro-CT mit vertikaler Schnittführung durch die Perforationslöcher einen Tag nach Anbohrung (B) und Mikrofrakturierung (MF). Die gefüllten Pfeilspitzen zeigen den verdichteten, frakturierten Knochen um die mikrofrakturierten Löcher. Die leeren Pfeilspitzen markieren Öffnungen in den subchondralen Raum nach Anbohrung. Als Eindringtiefe wurden 2 mm gewählt. (modifiziert nach Chen et al. 2009).....	69
Abbildung 40: Benutzeranleitung zur Bestimmung der quantitativen Defektfüllung mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ.....	93



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Eigenschaften der gängigen Knorpelmodelle (modifiziert nach Hurschler und Abedian 2013).....	9
Tabelle 2: ICRS-Klassifikation von Knorpelschäden (modifiziert nach Brix und Chiari 2012, Brittberg und Winalski 2003 und Braun et al. 2007) (Bilder abgerufen am 24.03.2017 von <a href="http://cartilage.org/society/publications/icrs-score/">http://cartilage.org/society/publications/icrs-score/</a> , International Cartilage Repair Society) .....	19
Tabelle 3: Detaillierte Übersicht über präklinischen Studien zu knochenmarkstimulierenden Verfahren. Aus den Angaben zu Anzahl der Löcher, Durchmesser des Instrumentes und der behandelten Defektfläche wurde der relative Anteil der perforierten Fläche berechnet. Abkürzungen: B = Bohrung, MF = Mikrofrakturierung, K = Kirschner-Draht, NF = Nanofrakturierung, MD = Microdrilling, n.a. = nicht angegeben.....	33
Tabelle 4: Behandlungsgruppen .....	37
Tabelle 5: Einheitlich verwendete Kennzeichnung statistischer Signifikanzen .....	47
Tabelle 6: Mittelwerte der prozentualen Defektfüllung [%] mit Standardabweichung und Stichprobenumfang in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe. ....	52
Tabelle 7: Mittelwerte der lokalen Knorpeldicken [mm] mit Standardabweichung und Stichprobenumfang in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe. # markiert die Anzahl der Ausreißer innerhalb der Gruppe. ....	53
Tabelle 8: Mittelwerte der Elastizitätsmoduln [MPa] mit Standardabweichung und Stichprobenumfang in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe. # markiert die Anzahl der Ausreißer innerhalb der Gruppe. ....	55
Tabelle 9: Mittelwerte der Kräfteverhältnisse [N/N] mit Standardabweichung und Stichprobenumfang in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe. # markiert die Anzahl der Ausreißer innerhalb der Gruppe. ....	56
Tabelle 10: Wertetabelle der biomechanischen Prüfung für die einzelnen Versuchsproben. ....	89
Tabelle 11: Messwerte der quantitativen Defektfüllung für die einzelnen Versuchsproben. ....	91

---

# Nomenklatur

## Abkürzungen

ANOVA	Analysis of variance; Varianzanalyse
AMIC	Autologe matrix-induzierte Chondrogenese
BMI	Body-Mass-Index
BMP	Bone morphogenetic protein / knochenmorphogenetisches Protein
BMS	Bone marrow stimulation / knochenmarkstimulierende Verfahren
CPM	Continous passive motion / kontinuierliche passive Bewegung
E-Modul	Elastizitätsmodul
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCD	Fixed charge density / fixierte Ladungsdichte
FE	Finite Elemente
GAGs	Glykosaminoglykane
ICRS	International Cartilage Repair Society
K-Draht	Kirschner-Draht
MACT	Matrixassoziierte autologe Chondrozytentransplantation
MFC	Mediale Femurkondyle
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
OAT	Osteochondraler Autograft Transfer
OD	Osteochondrosis dissecans
PBS	Phosphate buffered saline / phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
SA	Standardabweichung
TGF	Transforming growth factor / transformierender Wachstumsfaktor
TSE	Turbo-Spin-Echo

**Griechische Symbole**

$\sigma$	Spannung
$\varepsilon$	Dehnung
$\kappa$	Skalierungsfaktor
$\nu$	Poissonzahl

**Lateinische Symbole**

$A$	Fläche
$a$	Radius des Indentors
$c$	Steifigkeit
$E$	Elastizitätsmodul
$F$	Kraft
$h$	Knorpeldicke

# 1 Einleitung

Echte Gelenke (Diarthrosen) stellen eine Verbindung von zwei oder mehr Knochen dar. Sie besitzen einen typischen Aufbau: Zwischen den mit Gelenkknorpel überzogenen Knochen befindet sich ein mit Flüssigkeit gefüllter Gelenkspalt, der die Beweglichkeit des Gelenkes ermöglicht. Umgeben wird das Gelenk von einer straffen Kapsel, die unter anderem für die Bildung der Gelenkflüssigkeit (Synovia) zuständig ist. (Aumüller et al. 2014)

Der hyaline Gelenkknorpel ist dabei die Grundlage der hohen Funktionalität des Gelenkes, indem er eine nahezu reibungsfreie Beweglichkeit ermöglicht und gleichzeitig einer optimalen Kraftübertragung dient (Mow et al. 1992). Schon bei alltäglichen Bewegungen wird er einem Vielfachen des Körpergewichtes ausgesetzt (Vannini et al. 2016). Bei Schäden im Gelenkknorpel kann es kurz- oder langfristig zu erheblichen Beschwerden wie Schwellung, Schmerzen und Bewegungseinschränkungen kommen (Anders et al. 2003).

Während bei ausgedehnten, arthrotischen Knorpelschäden an operativen Therapiemöglichkeiten meist nur noch der künstliche Gelenkersatz eine Funktionswiederherstellung gewährleisten kann (Orth et al. 2016a), kommen bei kleineren, umschriebenen Defekten knorpelersetzende, -reparierende und -regenerierende Verfahren zum Einsatz (Welsch et al. 2016). Bei der Durchführung von Kniegelenksarthroskopien durchaus unterschiedlicher Indikation konnten solche fokale, vollschichtige Knorpeldefekte bei bis zu 19% der Patienten diagnostiziert werden (Curl et al. 1997). Die Dringlichkeit einer adäquaten Behandlung dieser Gelenkschäden steht also außer Frage. Gerade die sogenannten knochenmarkstimulierenden Verfahren wie die Anbohrung des subchondralen Knochens (Pridie K. H. 1959) und die Mikrofrakturierung (Steadman et al. 1999) kommen hierbei häufig zum Einsatz. Beiden Techniken gemein ist die Bildung eines regenerativen Ersatzgewebes, das den ursprünglichen Defektbereich ausfüllen soll (Kreuz 2016). Obwohl diese Methoden im klinischen Alltag etabliert sind (Nehrer 2012; Proffen et al. 2012; Steinwachs et al. 2011), lassen sich nur wenige präklinische Studien finden, die die Variablen bei der technischen Durchführung der knochenmarkstimulierenden Verfahren hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die mechanischen Eigenschaften des Regeneratknorpels untersuchen.

Ziel dieser Arbeit ist die systematische, biomechanische Analyse des Regeneratgewebes 12 Monate nach standardisierter Behandlung von vollschichtigen Knorpeldefekten mittels Anbohrung und Mikrofrakturierung im Schafsmodell. Hierzu wird zunächst die

quantitative Defektfüllung mittels halbautomatisierter Bildanalyse bestimmt. Anschließend erfolgen die Messung der Knorpeldicke und schließlich die stufenweise Indentation des Regeneratgewebes zur Prüfung der biomechanischen, viskoelastischen Eigenschaften.

## 2 Stand der Forschung

Die Kenntnis des strukturellen Aufbaus von hyalinem Knorpel ist die Basis für das Verständnis der Funktionalität des Gewebes. Darauf aufbauend werden Modelle und Materialkennwerte erläutert, die bei der biomechanischen Charakterisierung von Gelenkknorpel von Bedeutung sind.

Im weiteren Verlauf wird das Krankheitsbild des umschriebenen Knorpeldefekts aus klinischer Sicht dargestellt. Dabei wird auf Epidemiologie, Ätiologie sowie das Beschwerdebild des Patienten mit umschriebenem Knorpelschaden eingegangen. Außerdem werden etablierte therapeutische Möglichkeiten vorgestellt, die zur Behandlung von umschriebenen Knorpeldefekten in Frage kommen. Es wird aufgezeigt welche Knorpelschäden sich für die Therapie mittels Anbohrung oder Mikrofrakturierung eignen und was die beiden Verfahren voneinander unterscheidet.

Abschließend wird die aktuelle präklinische Studienlage zu knochenmarkstimulierenden Verfahren dargestellt. An dieser Stelle werden entscheidende Variablen in der technischen Ausführung dieser knorpelchirurgischen Therapiemethoden erarbeitet, die die Grundlage der unterschiedlichen Behandlungsgruppen unserer Studie bilden.

### 2.1 Grundlagen der Knorpelstruktur und -biomechanik

Knorpelgewebe ist eine Unterform des Binde- und Stützgewebes. Es liegen drei verschiedenen Formen vor, die sich vor allem in der Zusammensetzung ihrer extrazellulären Matrix unterscheiden (Lüllmann-Rauch 2015). Der hyaline Knorpel ist besonders reich an Kollagen Typ II, bedeckt die Knochenoberflächen in diarthrotischen Gelenken und ist damit die häufigste Knorpelart beim Menschen (Welsch 2006).

Faserknorpel besitzt dagegen große Mengen Kollagenfasern vom Typ I und gibt damit zum Beispiel dem Anulus fibrosus der Zwischenwirbelscheiben seine Druck- und Reißfestigkeit. Eine weitere Form von Knorpelgewebe ist der elastische Knorpel, der aufgrund seines hohen Anteils an elastischen Fasern sehr biegsam ist und unter anderem in der Ohrmuschel zu finden ist (Junqueira et al. 2005; Lüllmann-Rauch 2015).

#### 2.1.1 Aufbau des hyalinen Knorpels

Makroskopisch weist der menschliche Gelenkknorpel ein weißlich glänzendes Erscheinungsbild auf. Die Dicke des hyalinen Knorpels wird für das menschliche Kniegelenk mit durchschnittlich 2,2 – 2,5 mm angegeben, wobei das Gewebe im Bereich des Tibiaplateaus am stärksten ausgebildet ist (Schneider-Wald et al. 2013; Frisbie et al. 2006a;

Franz et al. 2001; Mow et al. 1992). Die spezialisierten Zellen des hyalinen Knorpelgewebes werden als Chondrozyten bezeichnet. Im Gegensatz zu anderen Gewebearten machen die Zellen beim Gelenkknorpel nur wenige Prozent der Gesamtmasse aus (Abbildung 1). Den weitaus größeren Mengenanteil besitzt die von den Chondrozyten produzierte extrazelluläre Matrix (EZM). Diese wiederum besteht hauptsächlich aus Wasser und Makromolekülen, vor allem Kollagen Typ II und Aggrecan (Aigner 2003; Martinek 2003).

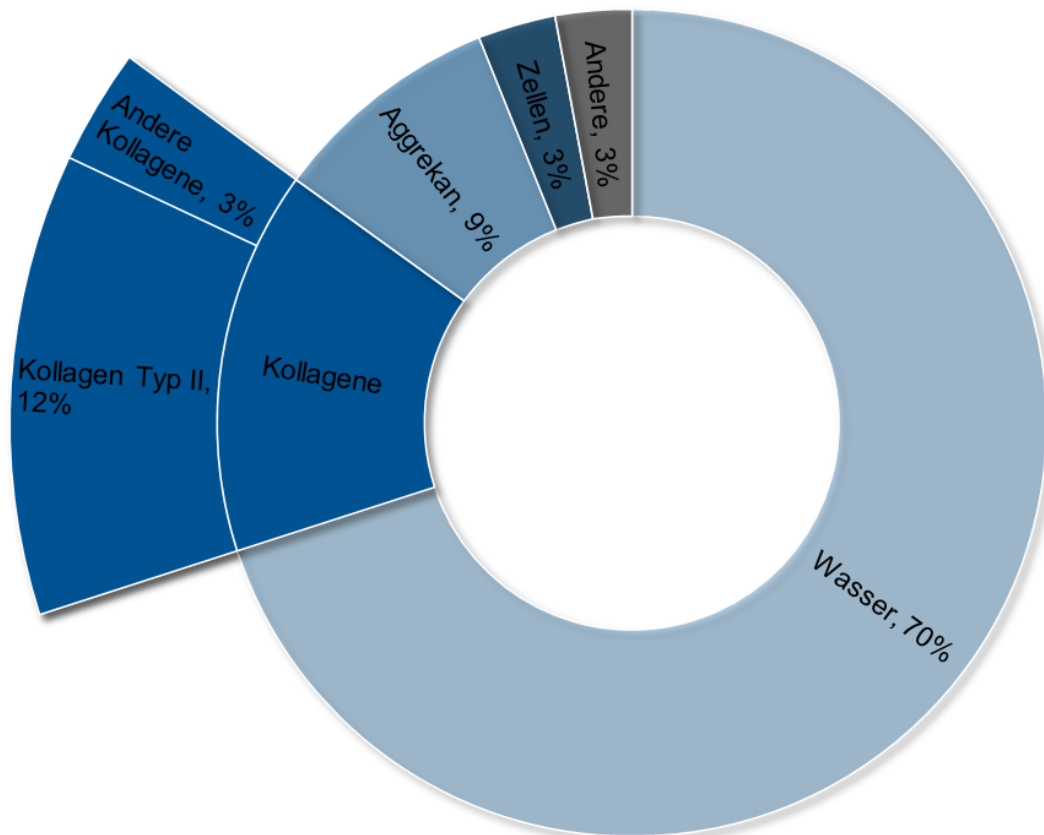
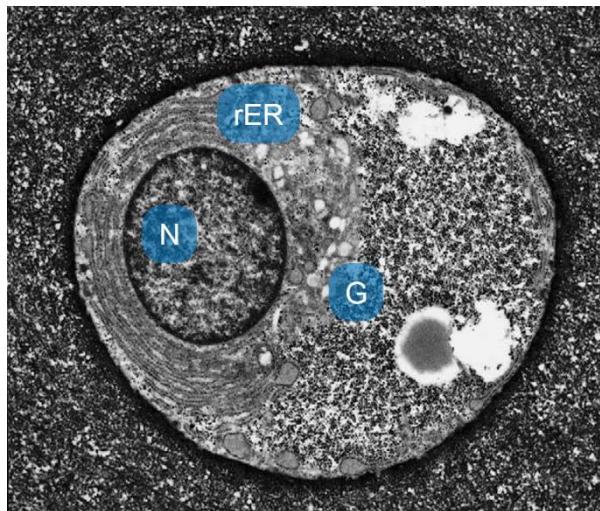


Abbildung 1: Übersicht über die strukturelle Zusammensetzung von Gelenkknorpel (modifiziert nach Aigner 2003)

Knorpelgewebe enthält weder Nerven noch Blut- oder Lymphgefäße (Buckwalter und Mankin 1998; Dijkgraaf et al. 1995). Dies hat mehrere Besonderheiten zur Folge. Da das Gewebe aneural aufgebaut ist, können im Knorpel selbst keine Schmerzreize wahrgenommen werden. Aufgrund der mangelnden Gefäßversorgung besitzt hyaliner Knorpel nur ein geringes Regenerationspotential (Archer und Francis-West 2003; van der Kraan et al. 2002). Die Ernährung erfolgt über Diffusion aus der Synovialflüssigkeit und dem subchondralen Knochen (Junqueira et al. 2005). Sie wird unterstützt durch eine bewegungsabhängige Durchwalkung des Gewebes, die die Zufuhr und den Abtransport von Nährstoffen und Sauerstoff erleichtert (Putz 2008).

### Chondrozyten

Die zentrale Aufgabe der Chondrozyten besteht in der Produktion und Aufrechterhaltung der EZM. Obwohl das Knorpelgewebe insgesamt ein bradytrophes Gewebe darstellt, sind die wenigen Chondrozyten sehr stoffwechselaktiv (Buckwalter und Mankin 1998). Histologisch spiegelt sich die starke metabolische Aktivität an der hohen Dichte des rauen endoplasmatischen Retikulums, der Golgi-Apparate und sekretorischen Vesikeln, sowie an einem im Verhältnis zum Nucleus sehr großen Anteil intrazellulärer Matrix wider (Abbildung 2).



*Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Chondrozyten mit Darstellung von Nucleus (N), rauem endoplasmatischem Retikulum (rER) und Golgi-Apparaten (G) (modifiziert nach Archer und Francis-West 2003)*

### Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix des Gelenkknorpels kann in eine flüssige und in eine feste Phase unterteilt werden. Die feste Phase besteht aus verschiedenen Makromolekülen wie Kollagenen und Proteoglykanen, die eine spezifische Anordnung annehmen und das Grundgerüst des Gelenkknorpels bilden (Abbildung 3). Die flüssige Phase dagegen besteht aus Wasser und Elektrolyten.

Mit etwa 60% des Trockengewichts stellen die Kollagenmoleküle den größten Anteil innerhalb der festen Phase des Gelenkknorpels dar (Buckwalter und Mankin 1998). Hierbei findet man vor allem Kollagen Typ II, das hierarchisch angeordnet, lange, quergestreifte Kollagenfasern bildet (Mow et al. 1992). Zusammen mit Kollagenen vom Typ IX, XI und einigen weiteren Typen bilden die Fasern das Grundgerüst des Knorpels und geben diesem seine hohe Zugfestigkeit (Aigner 2003).



Neben den Kollagenen besteht die feste Phase zu etwa 30% aus Proteoglykanen. Auch diese Moleküle folgen einem hierarchischen Aufbau. Proteoglykane bestehen zum einen aus einem Proteinkern und zum anderen aus einer großen Anzahl an kohlenhydratreichen Seitenketten, den Glykosaminoglykanen (GAGs). Im hyalinen Knorpel machen Chondroitinsulfat und Keratansulfat den Großteil der GAGs aus. Da GAGs negative Ladungen aufweisen, sind Proteoglykane stark hydrophile Moleküle, die große Mengen Wasser anziehen und binden können. Über 90% der Proteoglykane sind wiederum nicht-kovalent an Hyaluronsäure gebunden und formieren dabei sehr große Proteoglykanaggregate, die sogenannten Aggrekane (Hall et al. 2003). Während die Kollagenfibrillen im Gewebe mit kovalenten Bindungen quervernetzt sind, werden die Proteoglykane mechanisch und elektrostatisch in dem Kollagennetzwerk verankert (Mow et al. 1992).

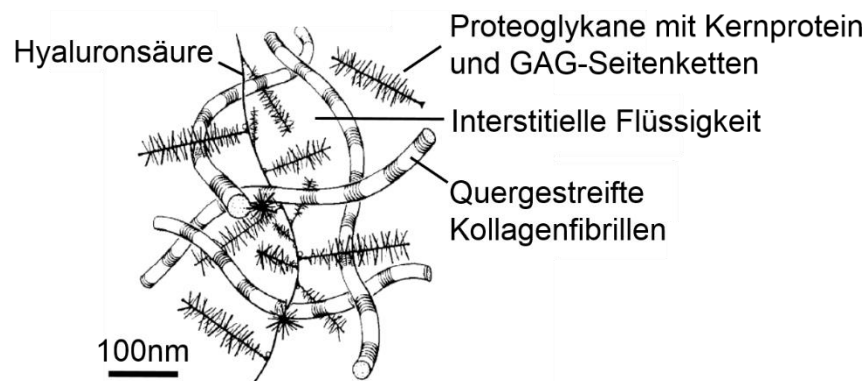


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Kollagennetzwerks in Interaktion mit Proteoglykanen, die gebunden an Hyaluronsäure die Aggrekane bilden (modifiziert Mow et al. 1992)

Die Synthese der EZM erfolgt wie bereits erwähnt durch die Chondrozyten. Mechanische Belastung stellt dabei einen wichtigen Stimulus für die Aktivierung des Stoffwechsels der Knorpelzellen dar (Loeser 2003; Muir 1995). Es konnte gezeigt werden, dass Ausmaß und Frequenz mechanischer Belastungen die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix beeinflussen und dass eine Immobilisierung zu einer Degradation des Gelenkknorpel führt (Cohen et al. 1998; Buckwalter und Mankin 1998; Fehrenbacher et al. 2003; Blain et al. 2003; Arokoski et al. 2000).

### Knorpelzonen

Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts hat Benninghoff den Aufbau des hyalinen Knorpels als arkadenartig mit einer zonalen Schichtung beschrieben (Benninghoff 1925). Die Einteilung in vier Zonen ist auch heute noch üblich, wobei die Übergänge zwischen den Schichten als fließend angesehen werden (Abbildung 4). Von der Gelenkoberfläche

zum Knochen hin werden die oberflächliche Tangentialzone, eine Übergangszone, die Radiärzone und der mineralisierte/kalzifizierte Knorpel unterschieden (Lüllmann-Rauch 2015; Mow et al. 1992). Die Gliederung des Knorpels in diese verschiedenen Zonen ergibt sich aus der Anordnung der Kollagenfibrillen sowie der Größe und Form der Chondrozyten (Benninghoff 1925).

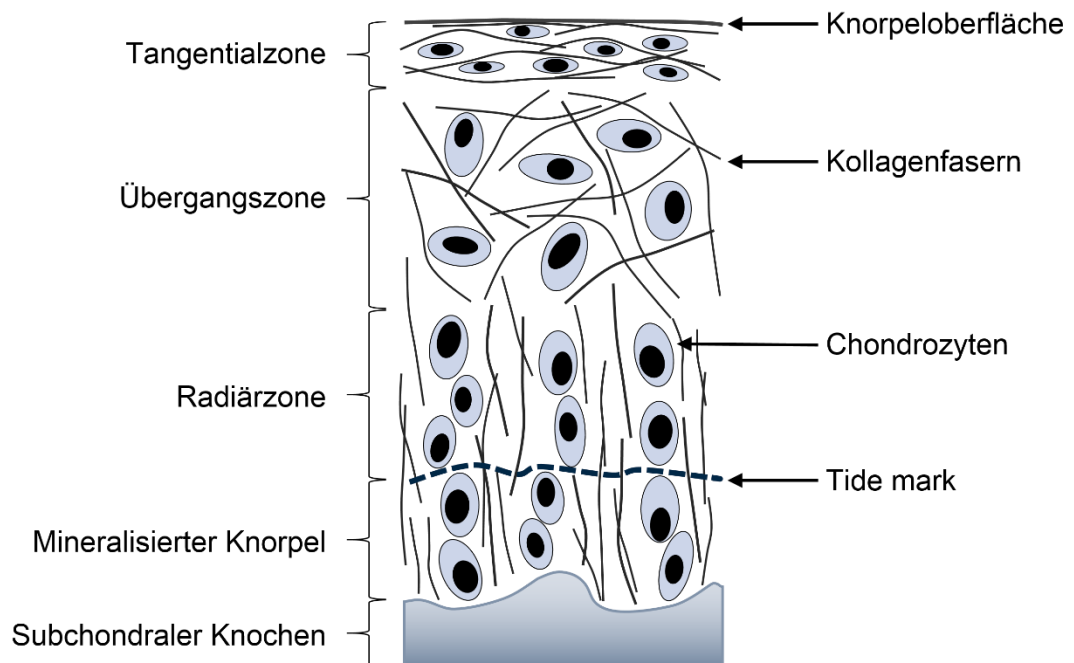


Abbildung 4: Zonale Schichtung des hyalinen Knorpels (modifiziert nach Mow et al. 1992)

In der Tangentialzone sind die vielen, dichten Kollagenfasern hauptsächlich parallel zur Knorpeloberfläche angeordnet. Die zahlreichen Chondrozyten haben eine oval-elliptische Form und liegen der Länge nach zwischen den Fasern. Diese Anordnung macht die dünne, oberflächlichste Schicht sehr widerstandsfähig gegenüber Scherkräften und verleiht ihr eine hohe Zugfestigkeit. In der Übergangszone liegen Kollagenfasern und Chondrozyten unregelmäßig verteilt. Die runden Zellen besitzen einen stoffwechselaktiven Aufbau und die EZM enthält in die Tiefe hin immer mehr Proteoglykane. In der Radiärzone bilden die Chondrozyten eine säulenartige Struktur aus und liegen zwischen den zur Knorpeloberfläche senkrecht stehenden Kollagenfasern. Diese Zone ist sehr reich an Proteoglykanen und besitzt einen geringeren Anteil an Kollagenen (Buckwalter und Mankin 1998). Abgegrenzt durch die sogenannte Tidemark schließt sich knochenwärts die Zone des kalzifizierten Knorpels an. Diese stellt eine Art Übergangszone vom hyalinen Knorpel zum subchondralen Knochen dar (Vanwanseele et al. 2002). Durch die gegenseitige Verzahnung des Knorpels mit dem Knochen werden Scherkräfte in

Druck- und Zugkräfte umgewandelt (Norrdin et al. 1999). Der angrenzende subchondrale Knochen ist im Gegensatz zum Knorpel vaskularisiert und trägt damit einen wichtigen Teil zur Ernährung und Regeneration des Gelenkknorpels bei (Imhof et al. 2000; Buckwalter und Mankin 1998; Mow et al. 1992).

### 2.1.2 Funktionelle Biomechanik von Gelenkknorpel

Innerhalb der letzten Jahrzehnte wurde eine Vielzahl biomechanischer Modelle unterschiedlicher Robustheit und Komplexität entwickelt, die Aufbau und Funktion des hyalinen Knorpels möglichst präzise widerspiegeln sollen (Hurschler und Abedian 2013). Basierend auf den theoretischen Modellen können wichtige Materialkennwerte bestimmt werden. Diese ermöglichen eine präzise, quantitative Darstellung der physiologischen Eigenschaften des nativen Knorpels und erlauben darüber hinaus den Vergleich zum Beispiel mit regenerativem oder arthrotischem Gewebe.

#### Knorpelmodelle

Ursprünglich wurde Knorpel als ein homogenes, linear-elastisches Material beschrieben, das unter einer gegebenen Belastung eine proportionale Verformung erfährt (Hayes et al. 1972). Einfache Versuche haben aber schon früh gezeigt, dass Knorpel unter gleichbleibender Belastung zusätzlich ein zeitabhängiges Verhalten zeigt, das sogenannte Kriechen. Wird das Gewebe komprimiert, wird es augenblicklich stark verformt. Die Verformung setzt sich allerdings in einem geringeren Maß noch über einen längeren Zeitraum fort, bis sich das Gewebe in einem Gleichgewicht, auch Equilibrium genannt, befindet. Unter Berücksichtigung dieses Phänomens entstand das visko-elastische Modell, das das elastische Modell um einen viskosen, dämpfenden Anteil ergänzte (Hayes und Mockros 1971).

Diese beiden relativ simplen Modelle werden dem inhomogenen, anisotropen, histologischen Aufbau des hyalinen Knorpels nicht in vollem Umfang gerecht (vgl. Kapitel 2.1.1). Die neueren Theorien beschreiben Knorpel folglich als bi- bzw. triphasisch (Mow et al. 1984; Hurschler und Abedian 2013). In dem biphasischen Modell wird die feste/solide von der flüssigen/fluiden Phase getrennt. Die feste Phase aus Chondrozyten, Kollagenfasern und Proteoglykanen stellt ein poroelastisches Grundgerüst dar. Die fluide Phase wird als unkomprimierbare, nicht-visköse Flüssigkeit betrachtet (Mak et al. 1987; Mansour 2003). Bei Belastung des Gewebes treten dreierlei interne Kräfte auf (Lu und Mow 2008). Erstens entsteht eine Spannung innerhalb der soliden, elastischen Matrix, zweitens steht die fluide Phase unter Druck und verursacht drittens bei der Strömung durch die Poren einen Reibungswiderstand.

Das triphasische Knorpelmodell berücksichtigt darüber hinaus noch die elektrochemischen Interaktionen, die aufgrund der negativ geladenen Seitenketten der GAGs entstehen (Hurschler und Abedian 2013). Es wird in diesem Zusammenhang auch von der Fixed Charge Density (FCD) gesprochen, also einer in der EZM fixierten Ladungsdichte. Die negativen Ladungen haben das Bestreben sich voneinander abzustößen, werden allerdings durch die Zugfestigkeit des Kollagennetzwerkes daran gehindert und bewirken folglich schon ohne Belastung eine Vorspannung im Knorpelgewebe (Lai et al. 1991). Gleichzeitig ist die hohe FCD stark osmotisch wirksam und zieht neben Elektrolyten viel Wasser in das Gewebe. Es entsteht ein Schwelldruck, der im Equilibrium einen 30 - 50%igen Anteil an der Steifigkeit von gesundem Gelenkknorpel trägt (Lu und Mow 2008; Laible 2003).

Tabelle 1: Übersicht über die Eigenschaften der gängigen Knorpelmodelle (modifiziert nach Hurschler und Abedian 2013)

Knorpelmodelle	Inhomogenität	Zeit-abhängigkeit	Feste und fluide Phase	Elektro-chemische Interaktionen
Linear-elastisch	-	-	-	-
Visko-elastisch	-	+	-	-
Biphasisch	+	+	+	-
Triphasisch	+	+	+	+

Die Knorpelmodelle wurden über die Jahre deutlich komplexer und so wird es zunehmend schwieriger den Überblick über die verschiedenen Theorien zu behalten (Tabelle 1). Die ursprünglichen Modelle wie zum Beispiel das linear-elastische Modell werden häufig bei beschreibenden/deskriptiven, biomechanischen Untersuchungen angewandt und erlauben dabei die relativ einfache Berechnung von mechanischen Materialkennwerten basierend auf den ermittelten Messwerten. Neuere Ansätze wie das triphasische Knorpelmodell besitzen dagegen vor allem auch einen prädiktiven Charakter. Mit Hilfe computergestützter Berechnungen erlauben sie Vorhersagen über die Änderungen mechanischer Eigenschaften bei differenter Knorpelstruktur (Hurschler und Abedian 2013). Als Beispiele hierfür seien der Regeneratknorpel und der arthrotische Knorpel genannt (Palmer et al. 2006; Arokoski et al. 2000).

Für weitere Details zu den Knorpelmodellen wird an dieser Stelle auf die einschlägige Literatur verwiesen (Hurschler und Abedian 2013; Mow et al. 1984).

### Materialkennwerte

Das Ziel biomechanischer Prüfungen ist die Bestimmung von klassischen Materialkennwerten, die Aussagen über die mechanische Kompetenz des untersuchten Gewebes erlauben. Die für diese Arbeit relevanten Kennwerte werden im Folgenden kurz erläutert werden.

Die Steifigkeit  $c$  beschreibt die Fähigkeit eines Körpers Widerstand gegen eine elastische Verformung zu leisten. Sie ergibt sich aus der Kraft  $F$  und der dadurch verursachten Längenänderung  $\Delta l$  (Formel 1) und trägt die SI-Einheit  $N/m$  (Brommundt et al. 2006).

$$c = \frac{F}{\Delta l} \quad (\text{Formel 1})$$

Wird die Längenänderung  $\Delta l$  bezogen auf die ursprüngliche Länge  $l_0$  betrachtet, ergibt sich die Dehnung  $\varepsilon$  (Balke 2014). Für den Laien mag der Begriff der Dehnung in Zusammenhang mit einer Kompression ungewöhnlich erscheinen. In der technischen Mechanik wird allerdings sowohl bei einer Längenzunahme beispielsweise durch Zug als auch bei einer Längenabnahme im Sinne einer Stauchung von Dehnung gesprochen.

Bei Dehnung eines Festkörpers verändert dieser nicht nur seine Länge, sondern auch seine Breite (Abbildung 5). Das Verhältnis von Querdehnung zu Längsdehnung wird als Querkontraktionszahl oder Poisson's ratio  $\nu$  bezeichnet und stellt eine Materialkonstante dar (Kabus 2013; Hurschler und Abedian 2013).

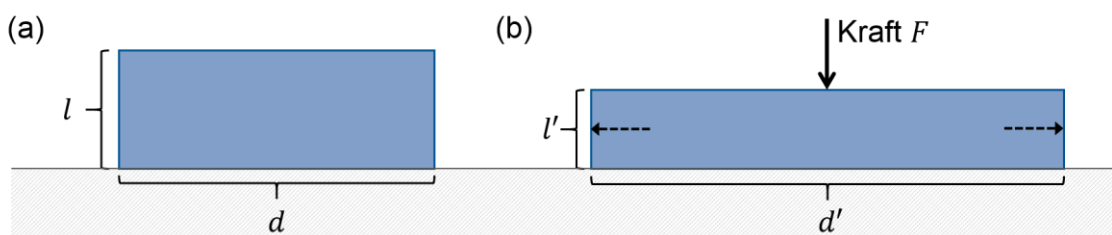


Abbildung 5: Längs- und Querdehnung eines Festkörpers der Länge  $l$  und Breite  $d$  vor (a) und nach (b) Einwirken der Kraft  $F$  (Brinckmann et al. 2000)

Eine weitere Größe, die bei der Berechnung biomechanischer Kennwerte eine wichtige Rolle spielt, ist die mechanische Spannung  $\sigma$ . Sie ergibt sich aus der Kraft  $F$ , die bei Belastung einer Probe aufgebracht wird, und der belasteten Fläche  $A$  (Formel 2) und wird in  $N/m^2 = Pa$  angegeben (Kabus 2013).

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (\text{Formel 2})$$

Der Zusammenhang zwischen Spannung und Dehnung wird im Spannungs-Dehnungs-Diagramm dargestellt (Abbildung 6). Bei einem weichen Material wie Knorpel bewirkt eine leichte Dehnung nur eine sehr geringe Spannung (Brinckmann et al. 2000). Mit Zunahme der Dehnung folgt ein Bereich, in dem Spannung und Dehnung direkt proportional zueinander sind (Töyräs et al. 1999; Hyttinen 2001). Dieser Bereich befindet sich meist bei 5-20% Dehnung (Jurvelin et al. 1997). Bei einer weiteren Zunahme der Spannung wird das Gewebe dauerhaft deformiert und lässt sich typischerweise wieder überproportional leicht dehnen (Freutel et al. 2014; Brinckmann et al. 2000).

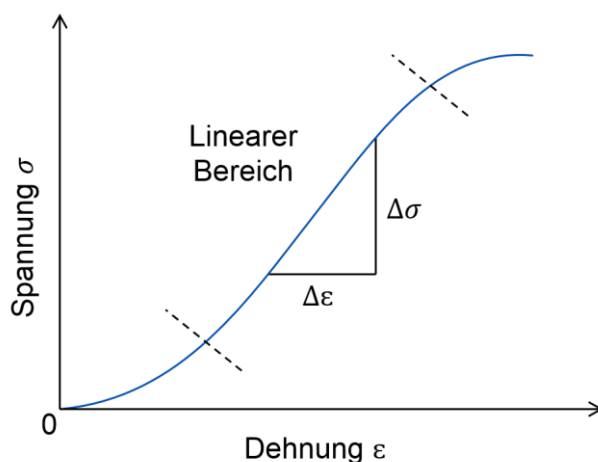


Abbildung 6: Typisches Spannungs-Dehnungs-Diagramm: die Steigung im linearen Bereich der Kurve ergibt den E-Modul (Brinckmann et al. 2000)

Aus den Werten im linearen Bereich des Spannungs-Dehnungs-Diagramms lässt sich der Elastizitätsmodul  $E$  (E-Modul, Young's Modulus) berechnen. Er ist festgelegt als Quotient aus Spannung und Dehnung (Formel 3) und entspricht der Steigung der Kurve im linearen Abschnitt. Der E-Modul besitzt üblicherweise die Dimension  $N/mm^2 = MPa$ .

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad (\text{Formel 3})$$

Im alltäglichen Sprachgebrauch werden Materialien mit einem hohen E-Modul als hart und diejenigen mit niedrigem E-Modul als weich bezeichnet (Brinckmann et al. 2000).

## Biomechanische Prüfverfahren

Gewöhnlich werden biomechanische Prüfverfahren *in-vitro* durchgeführt. Die drei gängigen, analytischen Methoden zur Untersuchung osteochondraler Proben sind die *unconfined compression* (UC), die *confined compression* (CC) und die *Indentation* (Abbildung 7).

Bei der *unconfined compression* wird die Probe ohne seitliche Begrenzung komprimiert, wobei der Durchmesser der Probe dem Durchmesser des zylindrischen Stempels entspricht. Das zu untersuchende Material kann sich unter Belastung folglich frei seitlich ausdehnen, was einen Widerspruch zu den *in-vivo* vorliegenden Bedingungen darstellt (Abbildung 7a). Die *confined compression* benutzt zusätzlich ein umfassendes Gefäß, in das die Probe eingebettet wird, womit eine seitliche Ausdehnung des Probenkörpers verhindert wird (Abbildung 7b). Bei dieser Methode wird außerdem ein poröser Stempel benutzt, um eine Umverteilung der flüssigen Phase über die Knorpeloberfläche hinweg zu ermöglichen. Zur *Indentation* werden Stempel mit einem geringeren Durchmesser verwendet. Da die Knorpel-Knochen-Proben dabei relativ groß sein können und im Gegensatz zu anderen Testverfahren keine zusätzlichen, künstlichen Effekte am Rand der Probe entstehen, wird die *Indentation* auch als *in-situ*-Verfahren bezeichnet. (Hurschler und Abedian 2013; Lu und Mow 2008; Mansour 2003)

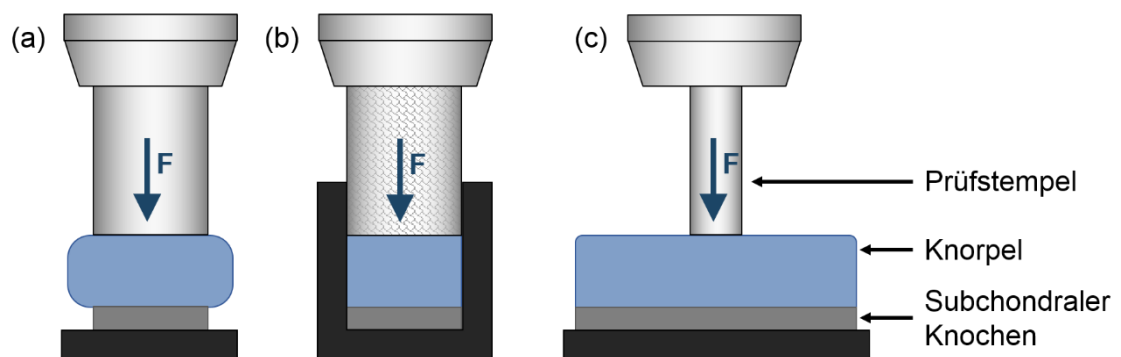


Abbildung 7: Drei verschiedene Methoden zur Prüfung osteochondraler Proben: *unconfined compression* (a), *confined compression* mit porösem Prüfstempel (b) und *Indentation* (c) (modifiziert nach Hurschler und Abedian 2013)

Mit modernen Prüfmaschinen sind frei programmierbare Prüfprotokolle möglich. Vereinfacht gilt es zwei grundsätzlich gegensätzliche Prüfverfahren zu unterscheiden, die auch die Basis für komplexe Protokolle bilden.

Der Stress-Relaxations-Versuch wird positionsgeregelt durchgeführt (Föhr et al. 2012). Hierzu verändert der Stempel seine Position um einen festgelegten Weg, dehnt dabei

die Probe und die Prüfmaschine misst die entstehenden Kräfte (Abbildung 8a). Das Gewebe baut initial eine große Spannung auf und erholt sich dann, wenn der Stempel für eine ausreichend lange Zeit an dieser Position gehalten wird (Lu und Mow 2008). Bei der Stress-Relaxation wird folglich anfänglich eine Spitzenkraft ( $F_{peak}$ ) und im Verlauf eine Kraft im Gleichgewicht bzw. Equilibrium ( $F_{equil}$ ) gemessen (Töyräs et al. 1999).

Beim Kriech-Versuch hingegen wird die Indentation nicht mittels Positions- sondern Kraftregelung durchgeführt (Abbildung 8b). In diesem Fall wird das Gewebe mit einer bestimmten Kraft belastet und die Maschine misst die genaue Lageänderung des Stempels (Föhr et al. 2012). Der Knorpel dehnt sich gleich zu Beginn der Belastung stark und gibt dann im weiteren Verlauf bei konstanter Belastung immer weniger nach, bis sich letztendlich auch hier ein Gleichgewicht einstellt. Dieses Verhalten wird wie bereits erwähnt als Kriechen (creep) bezeichnet. (Hurschler und Abedian 2013)

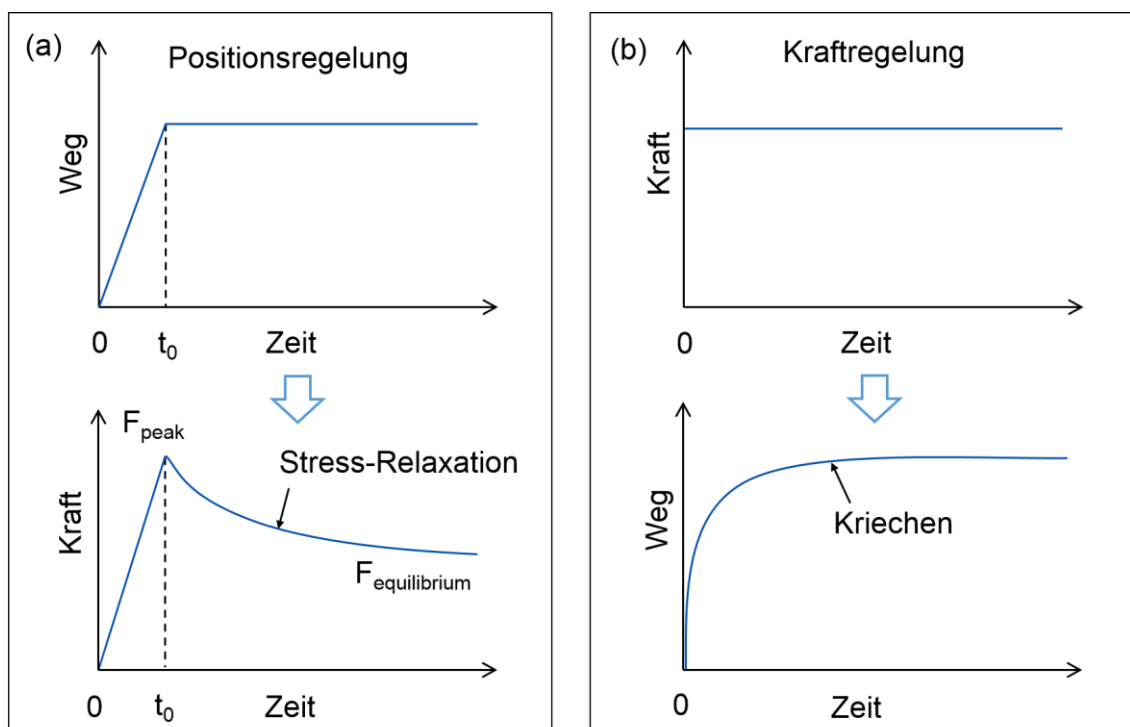


Abbildung 8: Weg-Zeit- bzw. Kraft-Zeit-Diagramme für den positionsgeregelten Stress-Relaxations-Versuch (a) und den kraftgeregelten Kriech-Versuch (b) (modifiziert nach Lu und Mow 2008)

### Numerische Methoden

Abschließend wird der Vollständigkeit halber noch ein Ausblick über die analytischen Prüfmethode hinaus zu den numerischen Methoden gegeben. Analytische Verfahren



bedienen sich wie bereits beschrieben experimentell ermittelter Daten, die unter Verwendung bekannter Gleichungen und Variablen verrechnet werden und exakte Ergebnisse liefern (Hurschler und Abedian 2013). Ein typisches Beispiel hierfür ist der in dieser Arbeit durchgeführte stufenweise Indentationsversuch (Töyräs et al. 1999). Anhand der im Experiment gemessenen Werte werden mit Hilfe von mathematischen Formeln genaue Materialkennwerte bestimmt (vgl. Kapitel 4.3.2).

Numerische Methoden hingegen sind computergestützte Rechenvorgänge, die zunächst relativ ungenaue Resultate ergeben und erst durch vielfache Wiederholung des Rechenvorgangs (Iteration) mit Hilfe elektronischer Datenverarbeitung der exakten Lösung angenähert werden (Knorrenschild 2013). Vorteil numerischer Verfahren ist, dass hiermit auch sehr komplexe Probleme gelöst werden können, bei denen analytische Verfahren an ihre Grenzen stoßen (Hurschler und Abedian 2013). Das derzeit wichtigste numerische Verfahren, das in der Knorpelbiomechanik Anwendung findet, sind die Finiten Elemente (FE-Modelle). Hierbei wird der komplexe hyaline Knorpel am Rechner in ein Netz aus vielen kleinen, simplen Teilkörpern, den Finiten Elementen, zerlegt (Clift 1992). Jedes Finite Element kann dann mit bestimmten mechanischen Eigenschaften versehen und in Größe und Anordnung variiert werden (Freutel et al. 2014; Li et al. 1999; Julkunen et al. 2008). Ziel ist es, dass das modellierte Knorpelkonstrukt möglichst exakt die zonale Schichtung und die biomechanischen Eigenschaften des reellen Gelenkknorpels widerspiegelt (Goldsmith et al. 1996). Anschließend können mit dem FE-Modell klassische biomechanische Versuche simuliert (Abbildung 9) und daraus komplexe Materialkennwerte numerisch bestimmt werden (Julkunen et al. 2007; Zhang et al. 1997). Darüber hinaus ermöglichen FE-Modelle die Vorhersage biomechanischer Eigenschaften von verändertem Knorpelgewebe wie zum Beispiel regenerativem oder arthrotischem Knorpel (Hurschler und Abedian 2013).

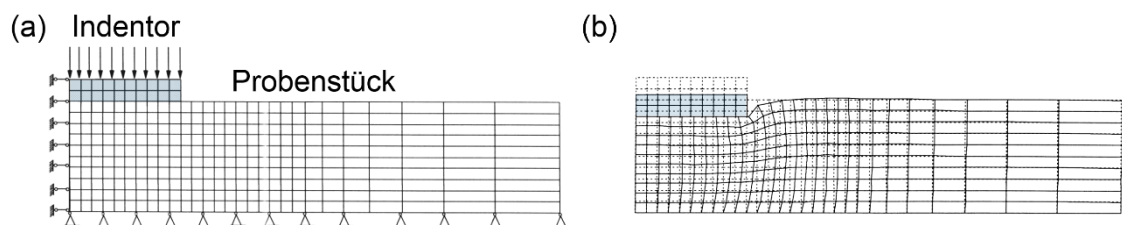


Abbildung 9: Das Netz eines axialsymmetrischen FE-Modells vor (a) und nach (b) Belastung mit einem zylindrischen Indentor (modifiziert nach Zhang et al. 1997)

## 2.2 Umschriebener Knorpeldefekt

Läsionen am Gelenkknorpel sind eine typische Begleiterscheinung traumatischer Kniegelenksschäden und betreffen häufig junge, sportlich aktive Menschen (Flanigan et al. 2010; Brix und Chiari 2012). Neben der akuten Behandlung von Schmerzen und Bewegungseinschränkungen gilt es vor allem langfristige Beschwerden durch fortschreitenden Gelenkverschleiß zu verhindern. Heutzutage ist eine Vielzahl an Verfahren zur Therapie umschriebener Knorpeldefekte verfügbar (Braun et al. 2007). Eine Klassifikation des Defektes ist daher nicht nur aus wissenschaftlicher Sicht interessant, sondern vor allem für die stadiengerechte Therapie von klinischer Relevanz (Brittberg und Winalski 2003).

### 2.2.1 Epidemiologie

Die größten epidemiologischen Studien zu umschriebenen Defekten am Gelenkknorpel basieren auf Beobachtungen, die im Rahmen von Kniegelenksarthroskopien gemacht wurden (Flanigan et al. 2010; Widuchowski et al. 2007; Curl et al. 1997). Sie beziehen sich also nicht auf die Allgemeinbevölkerung, sondern auf Patienten, die aufgrund von Kniegelenksbeschwerden eine arthroskopische Untersuchung erhielten. Trotzdem besitzen diese Werte eine große Aussagekraft, denn laut Statistischem Bundesamt wurden im Jahr 2014 in Deutschland allein im vollstationären Bereich über 280.000 arthroskopische Operationen am Gelenkknorpel und an den Menisken durchgeführt (Statistisches Bundesamt 2015). In einer retrospektiven, systematischen Analyse von rund 31.500 Kniegelenksarthroskopien in den USA wurden in 19,2% der Fälle fokale Knorpeldefekte gefunden, die bis auf den subchondralen Knochen reichten (Curl et al. 1997). Bei Athleten wurde die Prävalenz dieser umschriebenen, vollschichtigen Defekte mit rund 36% sogar noch deutlich höher angegeben (Flanigan et al. 2010). Das durchschnittliche Alter der betroffenen Patienten beträgt je nach Quelle 35 (Årøen et al. 2004) bis 43 Jahre (Curl et al. 1997). Gefunden werden die Defekte außerdem eher bei übergewichtigen Personen. Der BMI der Patienten mit vollschichtigem Knorpeldefekt beträgt gemäß einer neuen, deutschen Studie durchschnittlich  $28 \text{ kg/m}^2$  (Niemeyer et al. 2016). Die Lokalisation der Läsionen innerhalb des Kniegelenks wird in der Literatur einheitlich angegeben: in erster Linie sind die mediale Femurkondyle und die patellare Gelenkfläche betroffen (Spahn et al. 2016; Flanigan et al. 2010; Curl et al. 1997; Årøen et al. 2004; Hjelle et al. 2002).

## 2.2.2 Ätiologie

Umschriebene Knorpeldefekte entstehen überwiegend im Rahmen eines akuten Traumas. Werden lokal Belastungsgrenzen des Gewebes überschritten, kommt es zur Verletzung des Knorpels. Besonders vulnerabel zeigt sich der hyaline Knorpel bei einer Kombination aus axialer Belastung und Rotationsscherkräften (Hjelle et al. 2002; Schewe et al. 2008). In zwei skandinavischen Studien geben 59% (Årøen et al. 2004) bzw. 61% (Hjelle et al. 2002) der Patienten mit chondralen Läsionen ein vorausgegangenes Trauma als den Auslöser der Beschwerden an. Innerhalb dieser Gruppe machen wiederum Sportverletzungen, allen voran Fußball und Handball, mit 49% den größten Anteil aus (Abbildung 10). Häufig finden sich daher auch begleitende Kniebinnenschäden, die von großer diagnostischer und therapeutischer Relevanz sind. Hier wird vor allem über Schäden des medialen Meniskus und des vorderen Kreuzbandes berichtet (Flanigan et al. 2010; Spahn et al. 2016; Hjelle et al. 2002; Curl et al. 1997).

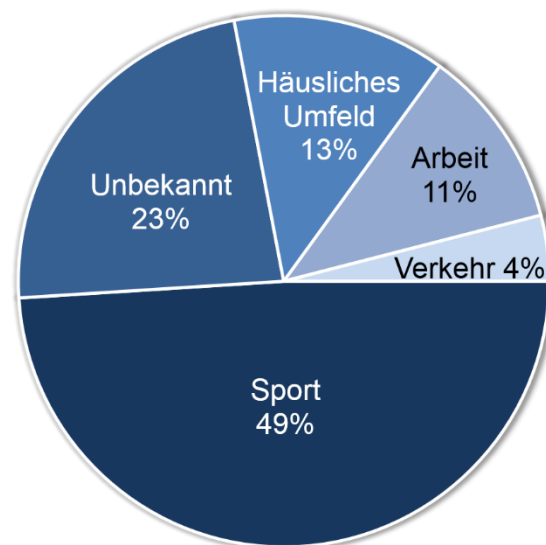


Abbildung 10: Die häufigsten Ursachen für Verletzungen des Gelenkknorpels bei erinnertlich vorangegangenem Trauma (modifiziert nach Årøen et al. 2004)

Degenerative Destruktion des Gelenkknorpels führt dagegen nur in sehr frühen Stadien zu fokalen Defekten. Meistens resultieren diese aus einer langjährigen Fehlbelastung basierend auf einer Achsfehlstellung des Gelenkes oder einer sekundären Instabilität nach nicht oder unzureichend behandelten Bänder- oder Meniskusverletzungen (Murray et al. 2015; Martinek und Imhoff 2003).

Als eine weitere Ursache eines umschriebenen Knorpelschadens muss die Osteochondrosis dissecans (OD) genannt werden, auch wenn diese mit einer Prävalenz von

15 bis 30 Fällen auf 100.000 Personen eine untergeordnete Rolle spielt (Kocher et al. 2006). Der genaue Auslöser hierfür ist bislang unbekannt, es werden unter anderem Durchblutungsstörungen des subchondralen Knochens sowie Mikrotraumen basierend auf repetitiven Überbelastungen diskutiert (Fritz et al. 2007; Schewe et al. 2008). Da der Schaden seinen Ursprung nicht im Knorpel, sondern im subchondralen Knochen nimmt, besitzt die OD hinsichtlich Diagnostik und Therapie eine Sonderstellung. An dieser Stelle wird auf die einschlägige Literatur verwiesen (Kocher et al. 2006).

Bemerkenswert ist zum Abschluss dieses Kapitels die Einführung einer multizentrischen Datenbank zur stetigen und detaillierten Erfassung von Knorpelschäden und deren operativen Therapie, welche durch die AG Klinische Geweberegeneration der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie veranlasst wurde. Im sogenannten KnorpelRegister DGOU werden seit 2013 Angaben zu Patienten, Behandlungsmethoden und -ergebnissen gesammelt und ausgewertet. Basierend auf dieser systematischen Analyse werden wahrscheinlich in naher Zukunft noch bessere, prospektive Daten zu Epidemiologie und Ätiologie von Knorpeldefekten verfügbar sein. (Niemeyer et al. 2015)

### 2.2.3 Klinische Präsentation

Patienten mit fokalen Knorpelläsionen können sich klinisch je nach Ursache und Ausmaß des Defektes sehr unterschiedlich präsentieren. Aus einer kombinierten Knieinnenverletzung resultieren im akuten Zustand unspezifische Symptome wie Schmerzen, Schwellung und Bewegungseinschränkung (Albrecht und Weise 2008). Die klinische Untersuchung ist schmerzbedingt häufig nur eingeschränkt beurteilbar und in Bezug auf den Knorpelschaden nur wenig aussagekräftig. Vielmehr sollte bei Vorliegen von positiven Meniskus- oder Kreuzbandzeichen sowie nach einer stattgehabten Patellaluxation immer auch an einen möglichen Knorpelschaden gedacht werden, da diese Pathologien wie bereits beschrieben häufig begleitend auftreten (Årøen et al. 2004).

Ein alleiniger, neu aufgetretener Knorpeldefekt kann aufgrund der fehlenden sensiblen Innervation des Gewebes zunächst klinisch inapparent verlaufen (Brix und Chiari 2012; Fritz et al. 2007). Die Freisetzung von Abriebpartikeln aus dem defekten Knorpel bewirkt im Verlauf eine begleitende Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes (Steinwachs et al. 2014). Die Folgen sind ein lokaler Belastungsschmerz und eine Schwellneigung des betroffenen Gelenkes. Werden darüber hinaus größere chondrale oder osteochondrale Fragmente (sogenannte „flakes“) losgelöst, die sich frei im Gelenk bewegen, können diese zu mechanischen Problemen wie Einklemmungserscheinungen, Krepitationen und sekundärer Schädigung des Gelenkes führen (Albrecht und Weise 2008).

Langfristig stellt ein unbehandelter, fokaler Knorpeldefekt einen Risikofaktor für die Entwicklung einer Arthrose dar (Cicutini et al. 2005; Schinhan et al. 2012). Folglich können Arthrose-typische Symptome wie Anlauf-, Belastungs- und später auch Ruheschmerzen entstehen (Manger et al. 2012).

### 2.2.4 Diagnostik und Klassifikation

Bei einem Verdacht auf einen lokalen Knorpelschaden muss zunächst eine gründliche Anamnese erhoben und eine klinische Untersuchung des Patienten durchgeführt werden (Brix und Chiari 2012). Aufgrund des relativ unspezifischen Beschwerdebildes (vgl. Kapitel 2.2.3) ist für die Diagnosestellung sowie für die Klassifikation und Therapieplanung in jedem Fall eine weiterführende, bildgebende Diagnostik erforderlich.

#### Röntgendiagnostik

Auch wenn die Röntgendiagnostik nur indirekte Aussagen über das Knorpelgewebe zulässt, liefert sie gerade bei frischen Kniegelenksdistorsionen wichtige Informationen, auf die selbst in Zeiten hochauflösender Schnittbildgebung nicht verzichtet werden kann (Schewe et al. 2008):

- Ausschluss von gelenknahen (Impressions-) Frakturen
- Darstellung freier, osteochondraler Gelenkkörper (Flakes)
- Darstellung knöcherner Defekte bei der OD
- Zeichen degenerativer Gelenksveränderungen (Gelenkspaltverschmälerung, osteophytäre Anbauten, subchondrale Sklerosierung oder Zystenbildung)

Bei Verdacht auf eine Achsabweichung des Beines kann die Standarddiagnostik des Kniegelenkes (Strahlengang anterior-posterior, seitlich und Patella tangential) durch eine Ganzbeinstandaufnahme zur Ermittlung der Beinachse ergänzt werden. (Albrecht und Weise 2008)

#### MRT

Die Kernspintomographie ist das Mittel der Wahl zur bildgebenden Diagnostik von Knorpelläsionen (Steinwachs et al. 2014). Moderne 1,5- oder 3-Tesla-Geräte stellen mit knorpelspezifischen Sequenzen Gelenkknorpel hochauflösend dar und erlauben die Klärung von Lokalisation, Größe und Tiefe von Knorpeldefekten (Schewe et al. 2008). Häufig wird beispielsweise die moderat T2-gewichtete, fettsupprimierte TSE-Sequenz verwendet, die Unregelmäßigkeiten an der Knorpeloberfläche durch den hohen Kontrast zur Gelenkflüssigkeit kenntlich macht (Welsch et al. 2016; Glaser 2009). Gleichzeitig können mittels MRT begleitende Pathologien an Menisken, Kreuzbändern oder Kollate-

ralbändern beurteilt werden (Schewe et al. 2008). Dank stetiger, technischer Weiterentwicklung werden Sensitivität und Spezifität der MRT-Untersuchung weiterhin steigen. Neuere Techniken wie die dGEMRIC-Bildgebung („delayed Gadolinium Enhanced MRI of Cartilage“) ermöglichen darüber hinaus Aussagen über die biochemische Konstitution des Knorpelgewebes *in-vivo* (Zilkens et al. 2009; Link et al. 2007) und werden womöglich in Zukunft noch an Bedeutung gewinnen.



### Diagnostische Arthroskopie







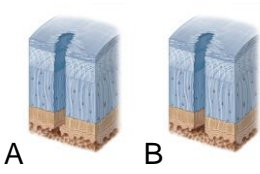
Bei radiologischem Verdacht auf einen Knorpeldefekt oder bei unklaren anhaltenden Gelenkbeschwerden besteht die Indikation zur arthroskopischen Untersuchung des Kniegelenkes (Albrecht und Weise 2008). Hierbei wird der Schaden evaluiert hinsichtlich der Breiten- und Tiefenausdehnung, der Mitbeteiligung des Knochens, sowie der Beschaffenheit des umliegenden Knorpels (Schewe et al. 2008). Aus dem diagnostischen Gesamtbild ergibt sich schließlich das Therapiekonzept, das stadiengerecht meist in der gleichen arthroskopischen Sitzung begonnen werden kann. Voraussetzung ist natürlich eine umfassende Aufklärung des Patienten.

### Klassifikation lokaler Knorpeldefekte

Anhand des arthroskopischen Befundes werden lokale Knorpeldefekte in verschiedene Stadien eingeteilt. Die Einteilung nach Bauer und Jackson (Bauer und Jackson 1988), unterscheidet die Defekte rein deskriptiv ihrer Form nach in sechs Typen (linienförmig, sternförmig, lappenförmig, kraterförmig, Fibrillations-, Degenerationstyp). Die Klassifikation ermöglicht eine Abschätzung der Ätiologie des Defektes (traumatisch vs. degenerativ), hat aber wenig therapeutische Konsequenz (Braun et al. 2007).

*Tabelle 2: ICRS-Klassifikation von Knorpelschäden (modifiziert nach Brix und Chiari 2012, Brittberg und Winalski 2003 und Braun et al. 2007) (Bilder abgerufen am 24.03.2017 von <http://cartilage.org/society/publications/icrs-score/>, International Cartilage Repair Society)*

Grad	Charakteristika
0	Normales Knorpelgewebe 
1 A	Intakte Oberfläche, aber Fibrillationen und/oder leichte Erweichung des Knorpels vorhanden 

B	Zusätzlich oberflächliche Einrisse/Fissuren	
2	Läsionstiefe < 50% der Knorpeldicke	
3 A	Läsionstiefe > 50% der Knorpeldicke, ohne Befall der kalzifizierten Schicht	
B	Läsionstiefe > 50% der Knorpeldicke, bis zur kalzifizierten Schicht	
C	Läsionstiefe > 50% der Knorpeldicke, bis zur subchondralen Platte	
D	Läsionstiefe > 50% der Knorpeldicke, mit Bildung von Blasen	
4 A/B	Vollschichtiger Knorpeldefekt, subchondrale Platte durchbrochen	

Von historischer Bedeutung ist die Klassifikation nach Outerbridge, die dieser zunächst für die Chondromalacia patellae eingeführt hatte (Outerbridge 1961). Aufbauend auf den vier Graden nach Outerbridge wurde von der International Cartilage Research Society das „ICRS Hyaline Cartilage Lesion Classification System“ entwickelt (Tabelle 2), das als internationaler Standard anzusehen ist (Brittberg und Winalski 2003). Dabei gilt es zu beachten, dass die Stadieneinteilung erst nach dem sorgfältigen Débridement des Knorpeldefektes vorgenommen wird, weil erst dann das vollständige Ausmaß des Defektes sichtbar wird (Braun et al. 2007).

Auch bei der Klassifikation nimmt die OD wiederum eine Sonderstellung ein, da der Defekt wie beschrieben nicht vom Knorpel, sondern primär vom Knochen ausgeht (Brittberg und Winalski 2003). Unter Berücksichtigung von Röntgen, MRT und Arthroskopie

wurde von Imhoff eine Einteilung osteochondraler Läsionen in 5 Stadien unternommen, die gleichzeitig von therapeutischer Konsequenz sind (Imhoff und König 2003). Da die Techniken der Mikrofrakturierung nach Steadman und die antegrade Anbohrung nach Pridie auf einem intakten subchondralen Knochen beruhen, spielen sie bei der OD kaum noch eine Rolle (Braun et al. 2007). Im Folgenden wird auf eine detaillierte Abhandlung der OD der Übersicht halber verzichtet und auf die einschlägige Literatur verwiesen (Imhoff und König 2003; Jerosch und Schulz 2003).

### 2.2.5 Stadiengerechte Therapie

Zur Therapie (osteo-) chondraler Läsionen stehen heutzutage eine Vielzahl unterschiedlicher Verfahren zur Verfügung. Während Techniken wie die knochenmarkstimulierenden Verfahren etabliert und weit verbreitet sind, werden fortlaufend neue Behandlungsmethoden entwickelt, die im klinischen Alltag erst noch erprobt werden müssen. Um die stadiengerechte Therapieempfehlung verstehen zu können, werden die Methoden zunächst getrennt vorgestellt.

#### Konservative Therapie

Allein durch konservative Maßnahmen ist eine kurative Therapie lokaler Knorpelschäden nicht möglich. Durch eine Gewichtsreduktion, dämpfende Einlagen, physiotherapeutische Beübung und gegebenenfalls gelenkstabilisierende Orthesen kann die lokale Belastung des Knorpels aber durchaus reduziert und ein Fortschreiten früher Defekte verzögert werden (Martinek und Imhoff 2003). Orale Analgetika werden rein symptomatisch eingesetzt, besitzen aber keinen Effekt auf den Gelenkknorpel. Die orale Einnahme sogenannter Chondroprotektiva (z.B. D-Glucosaminsulfat, Chondroitinsulfat) zeigt klinischen Studien zufolge bei Arthrosepatienten eine symptomlindernde Wirkung (Sawitzke et al. 2010). Ein struktureller Effekt konnte bislang nicht bewiesen werden (Martinek und Imhoff 2003). Die intraartikuläre Injektion von Hyaluronsäure bei Patienten mit Arthrose scheint keinen Vorteil gegenüber Placebo zu besitzen, birgt aber stets ein Infektionsrisiko (Jevsevar et al. 2015).

#### Lavage und Débridement

Die chirurgische Säuberung des Gelenkes besitzt eigenständig zwar lediglich kurzfristige, symptomatische Effekte, sollte aber jedem weiteren operativen Verfahren vorausgehen (Braun et al. 2007). Durch die Entfernung loser Knorpelteile und Glättung aufgerauter Bereiche werden mechanische Irritationen verringert und ein stabiler Knorpelrand für anschließende therapeutische Schritte geschaffen (Brix und Chiari 2012; Marlovits und Vécsei 2000). Bei der Lavage werden darüber hinaus Entzündungsmediatoren aus



der Gelenkflüssigkeit gespült, was eine Linderung der Beschwerden bewirken kann (Niemeyer et al. 2007).

### Knochenmarkstimulierende Verfahren (Bone marrow stimulation, BMS)

Unter dem Oberbegriff der knochenmarkstimulierenden Verfahren werden dreierlei Techniken zusammengefasst. Die Abrasionsarthroplastik nach Johnson stellt lediglich eine palliative Lösung da und besitzt heutzutage eher historischen Charakter. Weiterhin zählen die Anbohrung des subchondralen Knochens nach Pridie und die von Steadman etablierte Mikrofrakturierung zu diesem Gebiet der regenerativen Medizin (Johnson 2001; Johnson 1986; Bert 1997; Pridie K. H. 1959; Steadman et al. 1999). Das gemeinsame Ziel ist die Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark. Durch die Eröffnung des subchondralen Raumes werden Vorläuferzellen ausgespült, die die Fähigkeit besitzen sich in Fibrochondrozyten zu differenzieren und ein faserknorpelähnliches Regeneratgewebe zu bilden (Bedi et al. 2010).

Bei der bereits 1959 von Pridie vorgeschlagenen Technik wird der subchondrale Knochen angebohrt. Pridie hat dieses Verfahren ursprünglich beim osteoarthrotischen Gelenk angewandt. Seine Idee war es, mit der Bohrung die pathologische, subchondrale Sklerosierung zu durchbrechen und damit die Ernährung des Knorpels von dem subchondralen spongiösen Knochen aus wieder zu ermöglichen (Pridie K. H. 1959). Im Verlauf wurde das Verfahren dann auf die Behandlung lokaler Knorpelschäden übertragen (Müller und Kohn 1999). Auf diesem Prinzip aufbauend hat Steadman in den 1980er-Jahren die Mikrofrakturierung entwickelt. Anstelle eines Bohrers verwendet er abgewinkelte Ahlen zur Penetration des subchondralen Knochens und ermöglicht damit eine arthroskopische Behandlung des Knorpelschadens (Steadman et al. 2010).

Nach einem standardisierten, arthroskopischen Rundgang im Kniegelenk wird der Knorpeldefekt möglichst vollständig dargestellt. Im ersten Schritt erfolgt ein ausgiebiges Debridement geschädigter Knorpelanteile, sodass eine stabile Knorpelkante am Defektrand entsteht (Abbildung 11). Anschließend wird die kalzifizierte Schicht am Defektboden mit einer Kürette vorsichtig abgetragen. Diese Schritte scheinen besonders wichtig zu sein, um dem aus dem Knochenmark austretenden Blutgerinnsel einen guten Halt und ein sicheres Containment zu geben (Steadman et al. 2001; Frisbie et al. 1999; Frisbie et al. 2006b). Nun werden von außen beginnend Löcher in den freiliegenden, subchondralen Knochen gepickt. Die Perforationen sollen möglichst dicht beieinanderliegen, aber genügend Abstand haben, um ein Einbrechen des Knochens zwischen den Löchern zu verhindern. Steadman hat hierfür einen Abstand von 3 - 4 mm vorgeschlagen. Außerdem sollen die Perforationen senkrecht zur Knochenoberfläche gesetzt werden, was durch die Verwendung abgewinkelter Ahlen vereinfacht wird. Um

eine ausreichende Eindringtiefe zu erreichen, empfiehlt Steadman, sich an dem Austreten von Fettaugen aus den Löchern zu orientieren. Dies spricht für die erfolgreiche Eröffnung des subchondralen Raumes mit Anschluss an das Knochenmark und wird bei etwa 4 mm Tiefe erreicht (Steadman et al. 1997). Die Bildung eines stabilen Blutgerinnsels, das das Defektareal möglichst vollständig ausfüllt, scheint für die Regenerationsfähigkeit des Gewebes von besonderer Bedeutung zu sein (Bedi et al. 2010). Dieser fibrinöse Thrombus enthält unter anderem Blutzellen, mesenchymale Stammzellen sowie Wachstumsfaktoren und wird aufgrund seines regenerativen Potenzials auch als Superclot bezeichnet (Steadman et al. 1997).

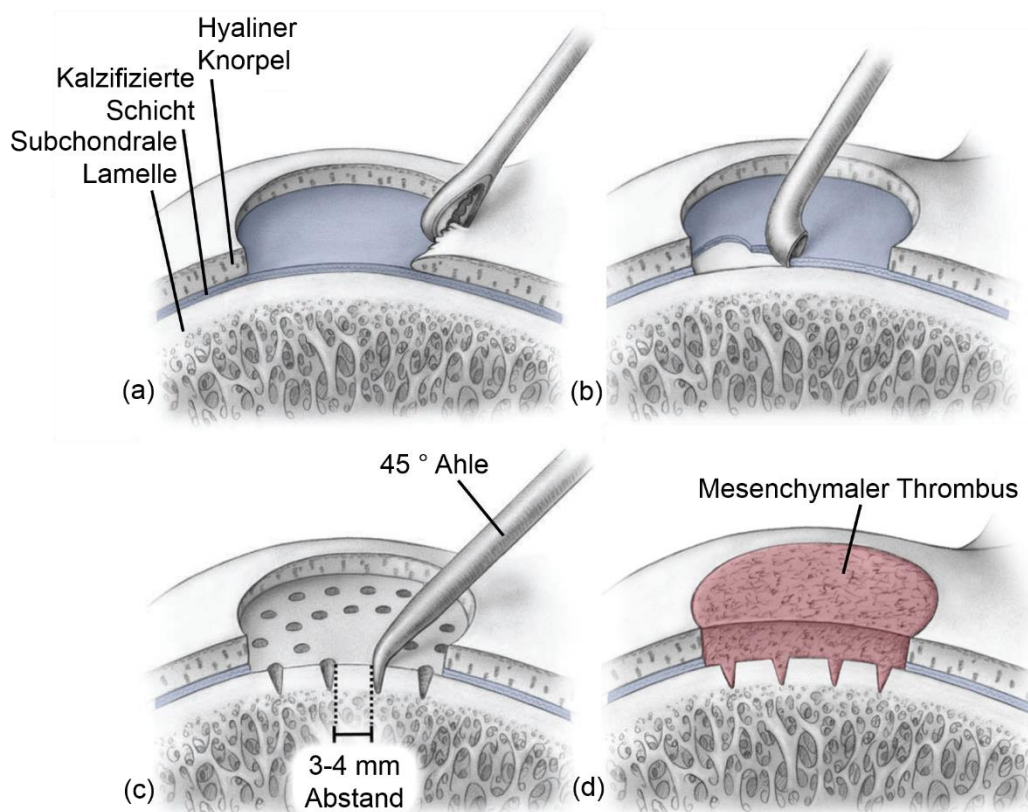


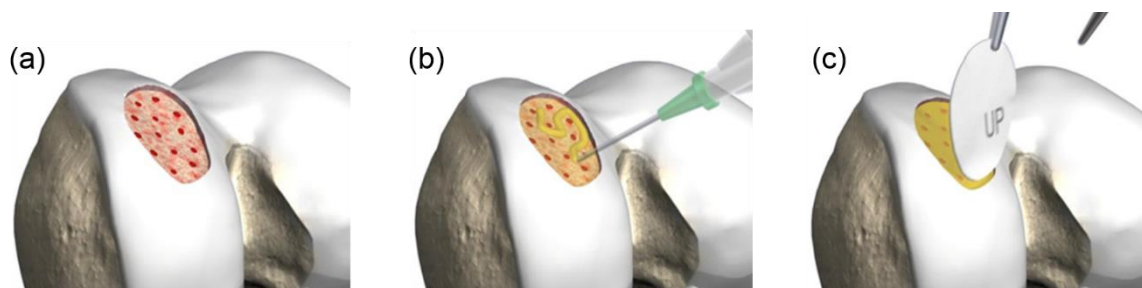
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Schritte der Mikrofrakturierung (modifiziert nach Mithoefer et al. 2006): Debridement und Schaffung stabiler Knorpelränder (a), Kürettage der kalzifizierten Knorpelschicht (b), Mikrofrakturierung senkrecht zur Knochenoberfläche mittels 45°-Ahle (c), Bildung eines stabilen mesenchymalen Thrombus (d)

Die Nachbehandlung spielt eine entscheidende Rolle für das langfristige Ergebnis der Mikrofrakturierung. Eine passive Mobilisierung mit Hilfe einer CPM-Schiene soll am ersten postoperativen Tag schmerzangepasst mit einem Bewegungsumfang zwischen 30° und 70° Flexion begonnen werden. Die CPM-Schiene soll täglich für 6 bis 8 Stunden angewendet werden und im Bewegungsausmaß langsam gesteigert werden. Ziel ist

eine frühe mechanische Stimulierung des Gewebes, was zu einer besseren Nährstoffversorgung und Differenzierung der Zellen führt (Proffen et al. 2012; Wondrasch 2016). Für etwa 6 Wochen wird eine Teilbelastung mit 20 kg empfohlen, gefolgt von einer schmerzadaptierten Aufbelastung. Die Rückkehr zum Sport ist je nach Patientengröße, -gewicht, Sportart und Defektgröße nach 4 bis 9 Monaten möglich (Steadman et al. 2010). Dieses postoperative Regime wird bei den nachfolgenden Verfahren weitgehend identisch angewandt (Welsch et al. 2016; Steinwachs et al. 2014; Braun et al. 2007).

#### Autologe matrix-induzierte Chondrogenese (AMIC<sup>®</sup>, Geistlich Surgery)

Die autologe matrix-induzierte Chondrogenese stellt eine Weiterentwicklung der knochenmarkstimulierenden Verfahren dar. Durch das Aufbringen einer biologischen Membran soll der Thrombus zusätzlich stabilisiert und damit die Geweberegeneration gefördert werden (Benthien und Behrens 2011; Bedi et al. 2010). Dies ermöglicht die Anwendung auch bei größeren Defekten, wofür die Mikrofrakturierung alleine nicht ausreichen würde (Welsch et al. 2016). Zuerst wird der Knorpeldefekt arthroskopisch debridiert und der subchondrale Knochen mittels Mikrofrakturierung oder Anbohrung eröffnet (Abbildung 12). Zur Durchführung des AMIC<sup>®</sup>-Verfahrens muss das Gelenk in einer Miniarthrotomie eröffnet werden und der Defekt in seiner vollen Größe dargestellt werden. Anschließend wird eine Kollagenmembran zugeschnitten und auf den Defekt aufgebracht (Brix und Chiari 2012). Die Fixierung erfolgt vornehmlich mittels Fibrinkleber (Benthien und Behrens 2010).



*Abbildung 12: Darstellung der wichtigsten Schritte der autologen matrix-induzierten Chondrogenese (modifiziert nach Gille et al. 2010): Mikrofrakturierung (a), Aufbringen des Fibrinklebers (b), Auflage der Kollagenmembran (c)*

Eine aktuelle Meta-Analyse sieht in dieser Kombination der BMS mit azellulären Biomaterialien eine Verbesserung der Knorpelregeneration gegenüber BMS alleine. Darüber hinaus scheint die Applikation von Wachstumsfaktoren, die die Geweberegeneration stimulieren (sogenannte Biologics wie z.B. TGF- $\beta$ , BMP), zusätzlich positive Effekte zu haben. (Pot et al. 2016)

### (Matrixassoziierte) Autologe Chondrozytentransplantation (MACT/ACT)

Die autologe Chondrozytentransplantation ist ein zweizeitiges Operationsverfahren und besteht aus folgenden Schritten (Behrens et al. 2004):

- 1) Arthroskopische Begutachtung des Knorpelschadens und Entnahme von Gelenkknorpel (z.B. im Bereich der Fossa intercondylaris femoris)
- 2) Isolation und Anzucht von Knorpelzellen im Zellkulturlabor aus der gewonnenen Knorpelprobe
- 3) Retransplantation der körpereigenen Zellen in die Knorpeldefektzone im Rahmen einer Miniarthrotomie nach 3 bis 8 Wochen

Bei der klassischen ACT wird dabei ein Periostlappen, der in der Regel von der Tibia-vorderkante entnommen wird, über den Knorpeldefekt genäht und die Chondrozytensuspension darunter gespritzt (Brittberg et al. 1994). Die Chondrozyten haften sich an den subchondralen Knochen und bilden ein Regeneratgewebe, das dem ursprünglichen hyalinen Knorpel ähnlich ist (Peterson et al. 2002).

Im Rahmen der matrixassoziierten ACT werden die Chondrozyten dagegen bereits im Labor auf eine Trägersubstanz (z.B. Kollagenvlies) aufgetragen oder auf dieser angezchtet und dann im Verbund transplantiert (Albrecht und Weise 2008). Ein Vorteil der MACT liegt also in der Vermeidung einer zusätzlichen Inzision zur Entnahme des Periostlappens und folglich Reduzierung der postoperativen Morbidität (Niemeyer et al. 2013; Brix und Chiari 2012; Marlovits et al. 2004).

### Autologe Knochen-Knorpel-Transplantation (OAT, osteochondral autograft transfer)

Grundprinzip der autologen Knochen-Knorpel-Transplantation ist die Entnahme eines osteochondralen Zylinders aus einem wenig belasteten Bereich des Gelenkes (z.B. entlang der proximalen, lateralen Kante des lateralen Femurkondylus) und Reimplanation desselben an der Stelle des Knorpeldefektes (Abbildung 13). Die 15 - 20 mm langen Stanzen werden mit Hilfe spezieller Rundmeißel entnommen, die in verschiedenen Durchmessern verfügbar sind. Die Verwendung eines minimal breiteren Autografts ermöglicht die Fixierung mittels Press-fit-Technik im Empfängertunnel (Imhoff et al. 1999; Bruns und Steinhagen 1999). Bei großen osteochondralen Defekten können mehrere kleinere Knorpel-Knochen-Zylinder transplantiert werden (sogenannte Mosaikplastik). Die große operative Herausforderung liegt dabei in der Schaffung einer mit der Umgebung kongruenten, ebenen und lückenlosen Gelenkfläche (Albrecht und Weise 2008).

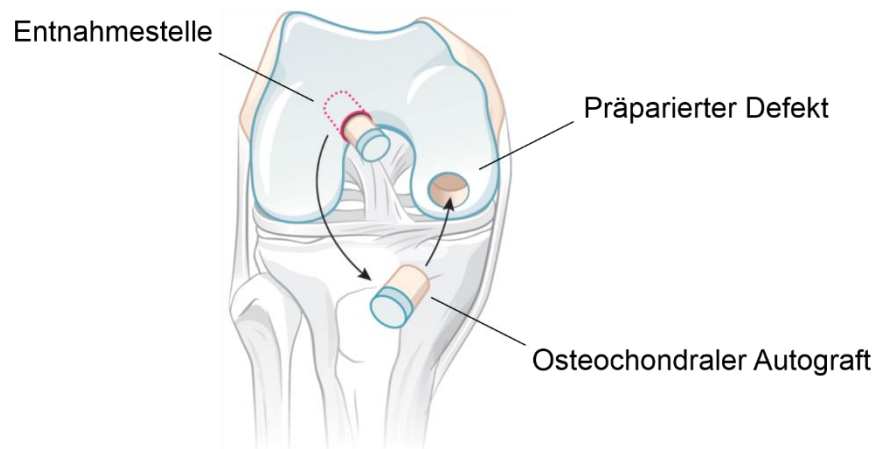


Abbildung 13: Autologe osteochondrale Transplantation (modifiziert nach Steinwachs et al. 2014)

Eine Weiterentwicklung der ursprünglichen Knochen-Knorpel-Transplantation stellt die Mega-OATS-Technik dar, bei der die posteriore, mediale Femurkondyle entnommen, präpariert und reimplantiert wird (Brucker et al. 2008). Dieses Verfahren kommt bei ausgedehnten Läsionen im Bereich der Belastungszone des Gelenkes als Salvage-Prozedur zum Einsatz (Braun et al. 2007).

#### Stadiengerechte Therapie

Bei oberflächlichen chondralen Defekten (ICRS Grade I und II) wird einheitlich eine konservative Therapie empfohlen (Steinwachs et al. 2014; Brix und Chiari 2012). Die Behandlungsalgorithmen fortgeschrittener Knorpeldefekte (ICRS-Grade III und IV) werden dagegen nicht immer einheitlich dargestellt (Welsch et al. 2016; Steinwachs et al. 2014; Brix und Chiari 2012; Proffen et al. 2012; Schewe et al. 2008; Braun et al. 2007). Bei den neuen oder weiterentwickelten Therapieverfahren fehlen bislang Langzeitstudien. Aber auch bei den etablierten Verfahren wie der Knochenmarkstimulierung, der autologen Chondrozytentransplantation und dem osteochondralen Autograft Transfer kommen die klinischen Studien zu inkonsistenten Ergebnissen (Proffen et al. 2012; Jakobsen 2005; Rodriguez-Merchan 2013). Die folgenden Ausführungen sollen Vor- und Nachteile der Verfahren erläutern und Indikationsschwerpunkte aufzeigen (Abbildung 14).

Prognostisch günstig sind generell ein intakter angrenzender Knorpel, eine möglichst intakte korrespondierende Gelenkfläche, ein gesunder Meniskus, eine physiologische Beinachse, sowie eine suffiziente Bandstabilität (Niemeyer et al. 2013).

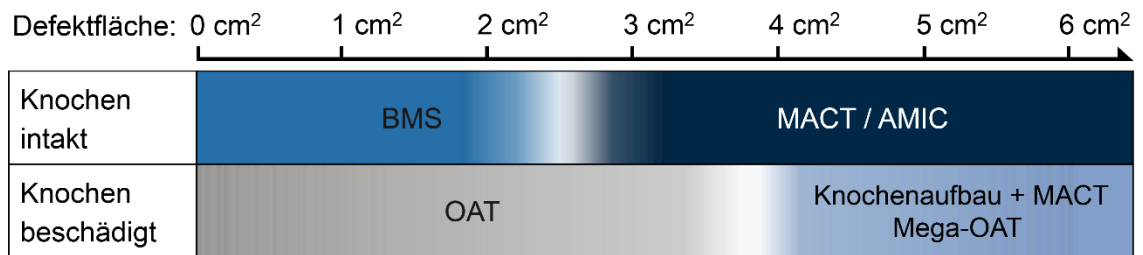


Abbildung 14: Therapiemöglichkeiten osteochondraler Defekte ICRS Grad III + IV in Abhängigkeit von der Beteiligung des subchondralen Knochens und der Defektgröße

Bei kleinen vollschichtigen Knorpeldefekten werden am häufigsten die knochenmarkstimulierenden Verfahren eingesetzt. Sie können arthroskopisch durchgeführt werden und sind kostengünstig und relativ simpel in der Anwendung (Steinwachs et al. 2014; Braun et al. 2007). Da das induzierte Regeneratgewebe allerdings zu einem großen Teil aus Faserknorpel besteht, ergeben sich aufgrund der reduzierten mechanischen Belastbarkeit langfristig Probleme mit der Haltbarkeit der Defektfüllung (Proffen et al. 2012). Aus diesem Grund ist es umso wichtiger die Indikation zur Behandlung mittels BMS richtig zu stellen. Grundvoraussetzung für die Anwendung knochenmarkstimulierender Verfahren ist ein intakter subchondraler Knochen (Welsch et al. 2016; Steadman et al. 1997). Einvernehmen besteht außerdem darüber, dass der Defekt möglichst klein sein sollte, um dem fibrinösen Thrombus eine stabile seitliche Abstützung zu geben. Die maximale Defektgröße wird in der Literatur zwischen 2,5 cm<sup>2</sup> (Steinwachs et al. 2014; Niemeyer et al. 2013; Brix und Chiari 2012; Schewe et al. 2008; Niemeyer et al. 2007; Braun et al. 2007; Fritz et al. 2007; Kreuz et al. 2006; Albrecht und Weise 2008) und 4 cm<sup>2</sup> (Welsch et al. 2016; Steadman et al. 2010; Benthien und Behrens 2013; Proffen et al. 2012) angegeben. Ein besseres Outcome wird generell berichtet für Patienten unter 35 Jahren, einem präoperativ hohen Aktivitätslevel, einem BMI < 30 kg/m<sup>2</sup> und einer möglichst kurzen Leidensgeschichte (Proffen et al. 2012), sodass all diese Faktoren in die Therapieentscheidung einbezogen werden sollten.

Größere, vollschichtige Knorpeldefekte bis zu 15 cm<sup>2</sup> werden vor allem mittels autologer Chondrozytentransplantation behandelt (Welsch et al. 2016; Albrecht und Weise 2008). Vorteil dieses Verfahrens ist die Bildung eines Ersatzgewebes, das große Ähnlichkeiten zum hyalinen Gelenknorpel besitzt und eine längere Haltbarkeit des Regenerats verspricht (Proffen et al. 2012). Wird zur Deckung des Defektes ein Periostlappen verwendet, gilt es, die Entnahmemorbidität zu beachten. Durch die Entwicklung neuer Biomaterialien als Trägermatrix (MACT) kann dies verhindert werden (Brix und Chiari 2012). Außerdem stellt die ACT ein kostenintensives, zweizeitiges Verfahren dar, das eine

Miniarthrotomie des Gelenkes benötigt. Folgen sind eine längere Behandlungsdauer, Vernarbungen, die zu Bewegungseinschränkungen führen können, größerer Verlust an Muskelmasse und eine verlängerte, reduzierte Mobilität (Proffen et al. 2012). Neuere Verfahren wie die autologe matrix-induzierte Chondrogenese könnten in Zukunft eine Alternative zur ACT darstellen. Das AMIC-Verfahren ist grundsätzlich auch bei größeren chondralen Defekten indiziert (Welsch et al. 2016). Bislang hat die Studienlage der AMIC-Technik allerdings noch keinen Bestand gegenüber der wissenschaftlichen Evidenz der Chondrozytentransplantation (Steinwachs et al. 2014).

Bei osteochondralen Defekten mit einer Größe von bis zu 4 cm<sup>2</sup> bietet sich die Transplantation autologer Knochen-Knorpel-Zylinder an (Proffen et al. 2012). Im Gegensatz zu allen anderen Techniken wird der Defekt hierbei mit körpereigenem, vollentwickeltem, hyalinem Knorpel aufgefüllt. Dies ermöglicht eine schnellere Belastbarkeit des Gelenkes verglichen mit den anderen Methoden (Steinwachs et al. 2014). Manche Autoren sehen aus diesem Grund auch bei den rein knorpeligen Defekten die Möglichkeit der Anwendung der Knochen-Knorpel-Transplantation (Proffen et al. 2012; Schewe et al. 2008). Nachteile sind allerdings die begrenzte Verfügbarkeit von Spender-Zylindern, die anspruchsvolle Operationstechnik, die entscheidend ist für ein gutes Outcome, sowie die Entnahmemorbidität (Steinwachs et al. 2014; Welsch et al. 2016; Braun et al. 2007). Zur Therapie von sehr großen osteochondralen Gelenkschäden stehen knochenaufbauende Verfahren in Verbindung mit einer zweizeitigen Chondrozytentransplantation oder das Mega-OAT-Verfahren als sogenannte Salvage-Prozeduren zu Verfügung (Welsch et al. 2016; Niemeyer et al. 2013). Die Verwendung von allogenen Knochen-Knorpel-Transplantaten scheint in diesem Fall erfolgsversprechend, kommt in Europa aufgrund der geringen Verfügbarkeit allogenen Spendermaterials bislang aber nur sehr selten zum Einsatz (Steinwachs et al. 2014).

Zusammenfassend stellt die Wahl des richtigen Therapieverfahrens eine große Herausforderung dar. Neben Größe und Tiefe des Gelenkschadens, spielen einige weitere Faktoren eine entscheidende Rolle: Alter, Gewicht und Aktivitätslevel des Patienten sind ebenso bedeutend wie die Erfahrungen des behandelnden Teams mit den zum Teil sehr anspruchsvollen und logistisch aufwendigen Techniken (Steinwachs et al. 2014; Proffen et al. 2012; Brix und Chiari 2012). Durch die standardisierte deutschlandweite Erfassung knorpelchirurgischer Eingriffe werden in Zukunft wahrscheinlich Daten zur Verfügung stehen, die die evidenzbasierte Wahl der Therapie lokaler Knorpelschäden erleichtern könnten (Maurer et al. 2016).

## 2.3 Präklinische Studienlage

Eine Vielzahl präklinischer Studien vergleicht die bereits vorgestellten knorpelchirurgischen Therapieverfahren gegeneinander (Methot et al. 2016; Pot et al. 2016; Koh et al. 2016; Beck et al. 2016; Chiang et al. 2010; Lane et al. 2010; Hoemann et al. 2007; Buma et al. 2003; Rudert et al. 1999). Zur Untersuchung der knochenmarkstimulierenden Verfahren an sich existieren jedoch nur wenige Daten. Die bestehenden Forschungsarbeiten stützen sich in erster Linie auf histologische und biochemische Analysen und vernachlässigen die biomechanischen Fähigkeiten des regenerativen Ersatzgewebes.

Die Operationstechnik der knochenmarkstimulierenden Verfahren kann in mehreren Faktoren variiert werden (Tabelle 5):

1. Die Methode der Perforation des subchondralen Knochens:  
Mikrofrakturierung vs. Anbohrung
2. Die Eindringtiefe in den subchondralen Knochen
3. Die Anzahl oder Dichte der Perforationen innerhalb des Knorpeldefektes
4. Der Durchmesser des zur Perforation verwendeten Instrumentes
5. Das Entfernen oder Belassen der kalzifizierten Knorpelschicht am Boden des Knorpeldefektes

Über den letztgenannten Punkt herrscht weitestgehend Einigkeit. Die kalzifizierte Knorpelschicht soll vollständig debridiert werden, um das Anheften des Superclots am Defektgrund zu erleichtern (Chen et al. 2011a; Frisbie et al. 1999; Frisbie et al. 2003; Steadman et al. 2010). Die subchondrale Knochenplatte soll dabei möglichst unverletzt bleiben. Mit dieser Vorgehensweise konnte in präklinischen Studie am Pferd nach vier bzw. zwölf Monaten Standzeit eine gesteigerte Füllung der Knorpeldefekte erzielt werden (Frisbie et al. 2006b).

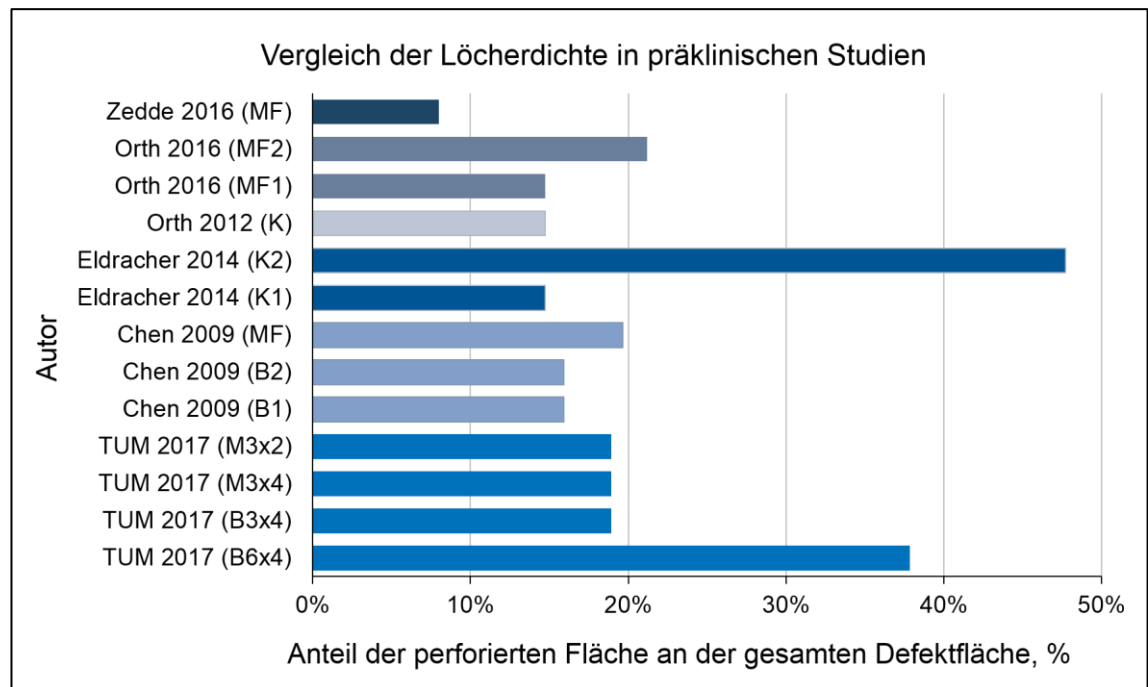
Die Mikrofrakturierung mittels Ahle und die Anbohrung mit einem echten Bohrer haben unterschiedliche Auswirkungen auf die Mikrostruktur des subchondralen Knochens. In der Literatur weit verbreitet ist die Annahme, dass die bei der Anbohrung des Knochens entstehende Reibung Hitzenekrosen verursachen und damit die Regenerationsfähigkeit des Gewebes negativ beeinflussen würde. Durch die Verwendung einer Ahle soll der Knochen schonender eröffnet werden und Nekrosen folglich vermieden werden (Steadman et al. 2001; Niemeyer et al. 2007; Resinger et al. 2004; Marlovits und Vécsei 2000). Neuere Studien, die besonderen Augenmerk auf die trabekuläre Struktur des Knochens legen, kamen allerdings zu Ergebnissen, die deutlich von dieser Annahme abwichen. Im Kaninchen-Modell wurden die Auswirkungen beider Techniken mittels mikro-CT und mit histologischen Schnitten von Chen et. al evaluiert. Die Anbohrung entfernte effektiv



alle Knochenrümpfer, es entstanden saubere Ränder in den Bohrkanälen, die feinen Tunnel in die Trabekel hinein blieben eröffnet und es wurden wenige leere Lakunen gefunden, die Hinweis auf nekrotisierte Osteozyten gegeben hätten (Chen et al. 2009). Im Gegensatz dazu bewirkte das Stößeln mit einer Ahle eine Frakturierung und Verdichtung der angrenzenden Knochenstrukturen. Die Hohlräume zwischen den Knochenbälkchen wurden versiegelt, was das Austreten des Blutes mit den mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark beeinträchtigen könnte. Darüber hinaus wurden bei der Mikrofrakturierung signifikant mehr leere Osteozytenlakunen gefunden als bei der Anbohrung, was von den Autoren auf eine direkte mechanische Schädigung der Osteozyten und die Abscherung des Gewebes zurückgeführt wurde (Chen et al. 2009). Während des Bohrvorgangs wurde bei dieser Studie auf eine sorgfältige Spülung geachtet. Hierdurch kann eine schädigende Hitzeentwicklung beim Bohren des Knochens effektiv verhindert werden (Augustin et al. 2008).

Explizit abgegrenzt werden soll an dieser Stelle die Perforation des subchondralen Knochens mittels Kirschner-Draht, was von manchen Autoren ebenfalls als Anbohrung bezeichnet wird (Orth et al. 2012; Eldracher et al. 2014). Die Funktionsweise eines Bohrers unterscheidet sich jedoch grundlegend von der eines rotierenden Kirschner-Drahtes. Während der Bohrer Knochen entfernt, wird mit dem Draht wiederum umliegendes Gewebe verdrängt, was eher dem Vorgang der Mikrofrakturierung gleicht.

Die optimale Eindringtiefe in den subchondralen Knochen ist Gegenstand der aktuellen Forschung. In den ursprünglichen Operationsanweisungen zur Mikrofrakturierung von Steadman wird eine Perforation bis in eine Tiefe von 2 mm bis 4 mm empfohlen. Auf jeden Fall soll auf eine Blutung aus den Löchern geachtet werden und die Perforationen vertieft werden, bis Fetttropfen sichtbar werden (Steadman et al. 1997). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass die Knorpelregeneration durch ein tieferes Eindringen verbessert werden kann ohne dabei dem subchondralen Knochen zu schaden (Chen et al. 2011b). In einer weiteren Studie am Kaninchen konnten nach 3 Monaten Standzeit durch die vergrößerte Bohrtiefe von 6 mm gegenüber 2 mm eine bessere Defektfüllung sowie ein höherer Gehalt an GAG und Kollagen Typ II im Knorpelregenerat nachgewiesen werden (Chen et al. 2011a).



*Abbildung 15: Vergleich der prozentualen Löcherdichte bei Anwendung von knochenmarkstimulierenden Verfahren in verschiedenen präklinischen Studien geordnet nach den Autoren. In den Klammern sind die verwendeten Methoden angegeben. Abkürzungen: B = Bohrung, MF = Mikrofrakturierung, K = Kirschner-Draht.*

Zum Vergleich der Löcherdichte innerhalb des Knorpeldefektes existieren bis Ende 2016 keine publizierten, präklinischen Studien. Steadman empfiehlt, die Mikrofrakturen vom äußeren Defektrand beginnend so nah wie möglich nebeneinander zu setzen, ohne dabei den dazwischenliegenden Knochen zu destabilisieren. Hierfür schlägt er einen Abstand von 3 – 4 mm zwischen den Löchern vor (Steadman et al. 2010). Dies entspricht 9 bis 16 Perforationen pro  $\text{cm}^2$ . Die berechnete Dichte an Löchern in verschiedenen präklinischen Studien variiert dagegen zwischen etwa 10 und 25 Löchern pro  $\text{cm}^2$  (Beck et al. 2016; Zedde et al. 2016; Chen et al. 2011a; Eldracher et al. 2014). Wird daraus der Anteil der perforierten Fläche an der gesamten Defektfläche ermittelt, entspricht dies je nach Größe des verwendeten Operationsinstrumentes 8 – 48% (Abbildung 15, Tabelle 3). Allerdings vergleicht keine dieser Studien intern die Auswirkung der Löcherdichte miteinander. Ob ein dichteres Raster an Perforationen vorteilhaft für die Bildung des Regeneratgewebes ist, gilt es also noch zu klären.

Der Durchmesser des zur Perforation verwendeten Instrumentes wurde bereits in einzelnen Studien analysiert. Im Schafsmodell wurden jeweils unterschiedlich große Kirschner-Drähte (Durchmesser 1,0 mm vs. 1,8 mm) und Ahlen (Durchmesser 1,0 mm vs. 1,2 mm) zur Knochenmarkstimulierung verwendet. Beide Studien berichten nach 6 Monaten Standzeit über bessere histologische Ergebnisse mit dem jeweils dünneren

Operationsinstrument (Orth et al. 2016b; Eldracher et al. 2014). Bemerkenswert ist allerdings auch, dass im Rahmen dieser und weiterer Studien häufig subchondrale Zysten (63%) und etwas seltener intraläsionale Osteophyten (26%) nach der knochenmarktstimulierenden Behandlung beobachtet wurden (Orth et al. 2012; Zedde et al. 2016; Beck et al. 2016). Ein Zusammenhang zwischen der Behandlungsmethode, dem Durchmesser der Instrumente und dem Auftreten dieser unerwünschten Effekte konnte aber bislang nicht festgestellt werden (Orth et al. 2016b). Insgesamt geht der Trend zur Verwendung von möglichst dünnen Operationsinstrumenten, die eine tiefe Penetration des subchondralen Knochens ermöglichen. In diesem Zusammenhang entstanden in den letzten Jahren neue Methoden wie die Nanofrakturierung mit einer 1,0 mm dünnen Nadel und einer Eindringtiefe von bis zu 9 mm (Benthien und Behrens 2013), sowie das sogenannte Microdrilling mit 0,5 mm dünnen Bohrern (Marchand et al. 2012). Eine erste kleinere Studie im Schafsmodell berichtet von einer geringeren trabekulären Verdichtung und Frakturierung, sowie von einer generell verbesserten Wiederherstellung der nativen, subchondralen Knochenstruktur bei Anwendung der Nanofrakturierung verglichen mit der klassischen Mikrofrakturierung (Zedde et al. 2016).

Tabelle 3: Detaillierte Übersicht über präklinischen Studien zu knochenmarkstimulierenden Verfahren. Aus den Angaben zu Anzahl der Löcher, Durchmesser des Instrumentes und der behandelten Defektfläche wurde der relative Anteil der perforierten Fläche berechnet. Abkürzungen: B = Bohrung, MF = Mikrofrakturierung, K = Kirschner-Draht, NF = Nanofrakturierung, MD = Microdrilling, n.a. = nicht angegeben.

Quelle	Tiermodell	Standzeit	Methode	Defektfläche [mm <sup>2</sup> ]	Anzahl der Löcher	Eindringtiefe	Ø Instrument	Relativer Anteil der perforierten Fläche an der Defektfläche
TUM 2017	Schaf	12 Mo.	B	28	3	4 mm	1,5 mm	19%
			B	28	6	4 mm	1,5 mm	38%
			MF	28	3	4 mm	1,5 mm	19%
			MF	28	3	2 mm	1,5 mm	19%
Chen et al. 2009	Kaninchen	1 Tag	B	16	4	6 mm	0,9 mm	16%
			B	16	4	2 mm	0,9 mm	16%
			MF	16	4	2 mm	1,0 mm	20%
Chen et al. 2011b	Kaninchen	3 Mo.	B	16	4	6 mm	0,9 mm	16%
			B	16	4	2 mm	0,9 mm	16%
			MF	16	4	2 mm	1,0 mm	20%
Chen et al. 2011a	Kaninchen	3 Mo.	B	16	4	6 mm	0,9 mm	16%
			B	16	4	2 mm	0,9 mm	16%
			MF	16	4	2 mm	1,0 mm	20%
Zedde et al. 2016	Schaf	6 Mo.	MF	50	3 bis 5	n.a.	n.a.	n.a.
			NF	50	3 bis 5	9 mm	1,0 mm	8%
Orth et al. 2012	Schaf	6 Mo.	K	32	6	10 mm	1,0 mm	15%
Eldracher et al. 2014	Schaf	6 Mo.	K	32	6	10 mm	1,0 mm	15%
			K	32	6	10 mm	1,8 mm	48%
Orth et al. 2016b	Schaf	6 Mo.	MF	32	6	5 mm	1,0 mm	15%
			MF	32	6	5 mm	1,2 mm	21%
Marchand et al. 2012	Kaninchen	6,5 Mo.	MD	n.a.	n.a.	n.a.	0,5 mm	n.a.
			MD	n.a.	n.a.	n.a.	0,8 mm	n.a.
Beck et al. 2016	Schaf	13 / 26 Wo.	MF	50	5	n.a.	n.a.	n.a.
Frisbie et al. 1999	Pferd	4 / 12 Mo.	MF	100	16	3 mm	n.a.	n.a.
Frisbie et al. 2003	Pferd	2, 4, 6, 8 Wo.	MF	100	16	3 mm	n.a.	n.a.
Frisbie et al. 2006b	Pferd	4 / 12 Mo.	MF	100	16	3 mm	n.a.	n.a.

### 3 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist die systematische, biomechanische Analyse des Regeneratgewebes 12 Monate nach standardisierter Behandlung von vollschichtigen Knorpeldefekten im Schafsmodell. Mikrofrakturierung und Anbohrung des subchondralen Knochens sind etablierte Verfahren zur regenerativen Behandlung lokaler Defekte des Gelenkknorpels. Zur Analyse wichtiger Variablen in der operativen Ausführung dieser Methoden wurden bislang nur wenige standardisierte, präklinische Studien durchgeführt. Darüber hinaus werden vornehmlich histologische und biochemische Untersuchungen angestellt, im Gegensatz zur deutlich selteneren Evaluierung von biomechanischen Parametern. Für die Funktionsweise von Gelenkknorpel ist die Quantifizierung dieser mechanischen, viskoelastischen Eigenschaften jedoch unabdingbar, da das Regeneratgewebe in der Lage sein muss, die ursprünglichen, physiologischen Lasten später wieder zu übernehmen.

In fünf verschiedenen Behandlungsgruppen soll festgestellt werden, ob und in welchem Ausmaß die folgenden Variablen mit der biomechanischen Kompetenz des Regeneratgewebes zusammenhängen:

- die Methode zur Eröffnung des subchondralen Knochens (Mikrofrakturierung vs. Anbohrung vs. unbehandelte Leerkontrollen)
- die Eindringtiefe in den Knochen (2 mm vs. 4 mm)
- die Löcherdichte innerhalb des Knorpeldefektes (3 Löcher vs. 6 Löcher im Defektbereich)

Zunächst werden die Unterschiede in der quantitativen Defektfüllung und der lokalen Gewebedicke der Regenerate bestimmt. Anschließend soll durch die Ermittlung des Elastizitätsmoduls, einem klassischen Materialkennwert, die Auswirkung der verschiedenen operativen Variablen auf die wichtigen biomechanischen Eigenschaften der Regenerate analysiert werden. Mit Hilfe eines hochdynamischen Prüfsystems gilt es feinste Unterschiede im viskoelastischen Verhalten der Gewebeproben herauszufinden.

## 4 Material und Methodik

Die Analyse klinisch etablierter Therapieverfahren wie der Mikrofrakturierung oder der Anbohrung erfolgt aufgrund der anatomischen und biologischen Ähnlichkeiten zum Menschen vorzugsweise im Großtiermodell. Zur umfassenden Charakterisierung von Gewebeproben besitzen biomechanische Testverfahren neben histologischen, biochemischen und radiologischen Analysen einen sehr hohen Stellenwert. Nur diese ermöglichen eine Überprüfung der mechanischen Kompetenz von Knorpelregeneraten. (Schneider-Wald et al. 2013)

### 4.1 Versuchsproben

Der Tierversuch im Rahmen des Projektes QuReGe (Funktionelle Qualitätssicherung von Regenerativen Gewebeersatzmaterialien für Knorpel und Meniskus) durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 0315577C mitfinanziert. Die Schafe wurden durch die Tierhaltung der TU München bereitgestellt sowie peri- und postoperativ betreut.

#### 4.1.1 Präklinisches Tiermodell

Verschiedene Tierspezies eignen sich laut Schneider-Wald et al. besonders gut für die präklinische Erforschung der Knorpelregeneration, da bei ihnen die Vergleichbarkeit zur humanen Anatomie gegeben ist und über ein analoges Regenerationspotential berichtet wird. Während der Hund und das Pferd immer seltener Verwendung finden, werden die meisten Studien am Schaf durchgeführt, gefolgt vom Schwein und der Ziege. Durchschnittlich werden 17,4 Tiere pro Studie eingeschlossen. Der Defekt wird überwiegend im lasttragenden Bereich der medialen Femurkondyle gesetzt. (Schneider-Wald et al. 2013)

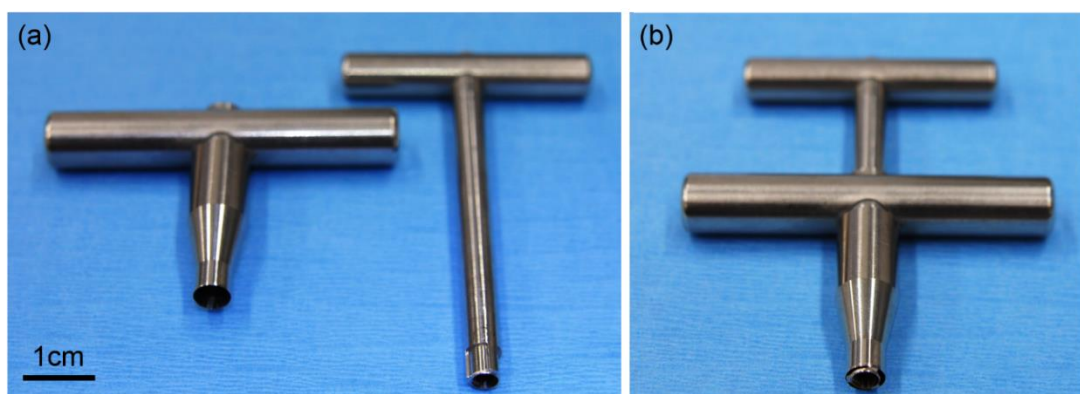


Abbildung 16: Stanze zum Setzen von runden, vollschichtigen Knorpeldefekten mit Durchmesser 6 mm. Instrumente einzeln (a) und zusammengesetzt (b).

Unserer Studie wurden an 33 ausgewachsenen Merinoschafen (> 6 Jahre) mit einem Körpergewicht von 65 – 75 kg durchgeführt. Mit Hilfe einer speziell angefertigten Stanze (Abbildung 16) erfolgte die Platzierung von jeweils zwei runden, vollschichtigen Knorpeldefekten mit Durchmesser  $d = 6$  mm, entsprechend eines ICRS-Knorpelschadens Grad III C mit einer Fläche von  $28,3 \text{ mm}^2$ . Die Geometrien der humanen und der ovinen medialen Femurkondylen (MFC) sind sich sehr ähnlich, allerdings ist die ovine MFC um etwa ein Drittel kleiner (Osterhoff et al. 2011). Überträgt man die Defektgröße unseres Schafsmodells also auf den Menschen, entspricht diese etwa einer Fläche von  $63 \text{ mm}^2$ . Des Weiteren besitzt ein ausgewachsenes Schaf im Kniegelenk eine Knorpeldicke von  $0,5 - 0,7$  mm, während menschlicher Gelenkknorpel in diesem Bereich eine Dicke von etwa  $2$  mm annimmt (Schneider-Wald et al. 2013). Die Defekte wurden im Bereich der Hauptbelastungszone der medialen Femurkondyle, 18-mal am rechten und 15-mal am linken Kniegelenk gesetzt. Am jeweiligen kontralateralen Kniegelenk wurde eine weitere Studie realisiert, sodass die Versuchstiere auf beiden Seiten operiert wurden. Folglich wurden postoperativ beide Gelenke gleichmäßig belasteten, was einer einseitigen Schonung eines der beiden Gelenke entgegenwirkte (Schneider-Wald et al. 2013).

### 4.1.2 Behandlungsgruppen

Das Setzen der Knorpeldefekte und die anschließende Defektbehandlung wurden im Rahmen einer Arthrotomie durchgeführt. Zur Behandlung der vollschichtigen Knorpeldefekte ( $n = 66$ ) erfolgte eine Einteilung in fünf Gruppen (Tabelle 4). Die erste Gruppe verblieb unbehandelt als Leerkontrollen. Dies diente der Bestätigung einer kritischen Defektgröße („critical size defect“) ohne Möglichkeit zur Selbstregeneration innerhalb des Untersuchungszeitraumes (Schneider-Wald et al. 2013). Zwei Gruppen wurden mit einer  $1,5$  mm dünnen Ahle mikrofrakturiert. Diese unterschieden sich lediglich anhand der Eindringtiefe ins Gewebe –  $2$  mm und  $4$  mm. Bei beiden Verfahren wurden jeweils drei Löcher gesetzt. In den beiden letzten Gruppen erfolgte eine Anbohrung des subchondralen Knochens mit einem  $1,5$  mm starken Bohrer, jeweils wiederum bis zu einer Tiefe von  $4$  mm. Bei Gruppe 4 wurden hierbei wieder drei Löcher gesetzt, bei Gruppe 5 wurden sechs Löcher gesetzt. Dies entspricht einer Dichte von  $11$  bzw.  $21$  Löchern pro Quadratzentimeter oder  $19\%$  bzw.  $38\%$  perforierter Defektfläche.

Tabelle 4: Behandlungsgruppen

Gruppennummer (Stichprobenumfang)		Behandlungsmethode	Anzahl der Löcher	Eindringtiefe
<b>Gruppe 1: Leer</b>	(n = 12)	Leerkontrolle	-	-
<b>Gruppe 2: M3x2</b>	(n = 12)	Mikrofrakturierung	3	2 mm
<b>Gruppe 3: M3x4</b>	(n = 14)	Mikrofrakturierung	3	4 mm
<b>Gruppe 4: B3x4</b>	(n = 16)	Anbohrung	3	4 mm
<b>Gruppe 5: B6x4</b>	(n = 12)	Anbohrung	6	4 mm

#### Operationsinstrumente

In einer kanadischen Studie wurden Knorpeldefekte an den Kniegelenken von Tierkadavern unter realistischen Bedingungen mittels Mikrofrakturierung arthroskopisch behandelt. Den erfahrenen Operateuren wurden genaue Anweisungen hinsichtlich Eindringtiefe (3 mm), Abstand zwischen den Löchern (4 mm) und Eindringwinkel (senkrecht) gegeben. Postoperativ wurden die Proben in einem micro-CT untersucht. Die Forschergruppe stellte fest, dass die Mikrofrakturierung deutlich tiefer, enger beisammen und in über der Hälfte der Fälle mit mehr als 10° Abweichung von der Senkrechten durchgeführt wurden. (Kroell et al. 2014)

Unabhängig von der klinischen Relevanz dieser Schwankungen muss bei einer systematischen, präklinischen Analyse von knochenmarkstimulierenden Verfahren die Vergleichbarkeit der operativen Behandlungsmethoden gewährleistet sein. Aus diesem Grund haben wir uns entschlossen, ein speziell für diese Studie angefertigtes Operationsbesteck zu verwenden (Abbildung 17). Durch den Einsatz einer Führungshilfe konnten sowohl die Eindringtiefe, der Abstand zwischen den Löchern, als auch der senkrechte Eindringwinkel standardisiert werden (Abbildung 18).



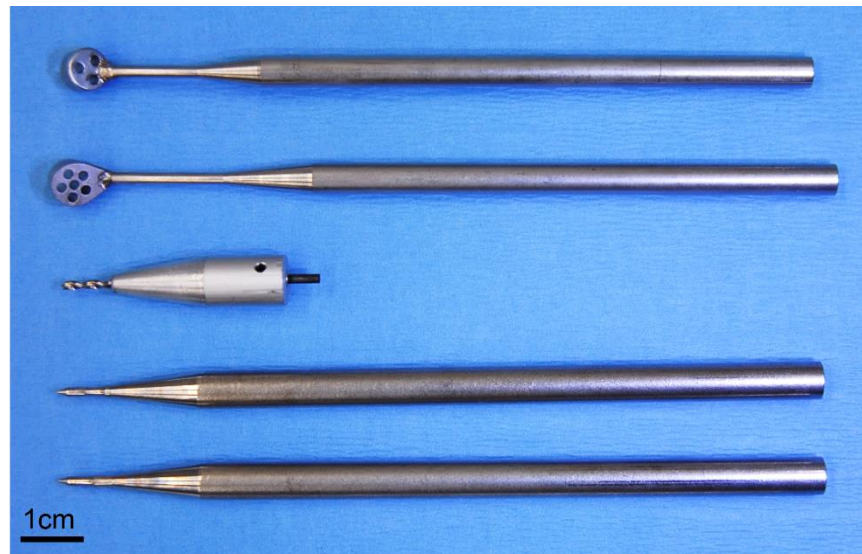


Abbildung 17: Individuell angefertigte Operationsinstrumente. Von oben nach unten: Führungshilfe für drei Löcher, Führungshilfe für sechs Löcher, Bohrer, Ahle für 4 mm tiefe Picks, Ahle für 2 mm tiefe Picks.

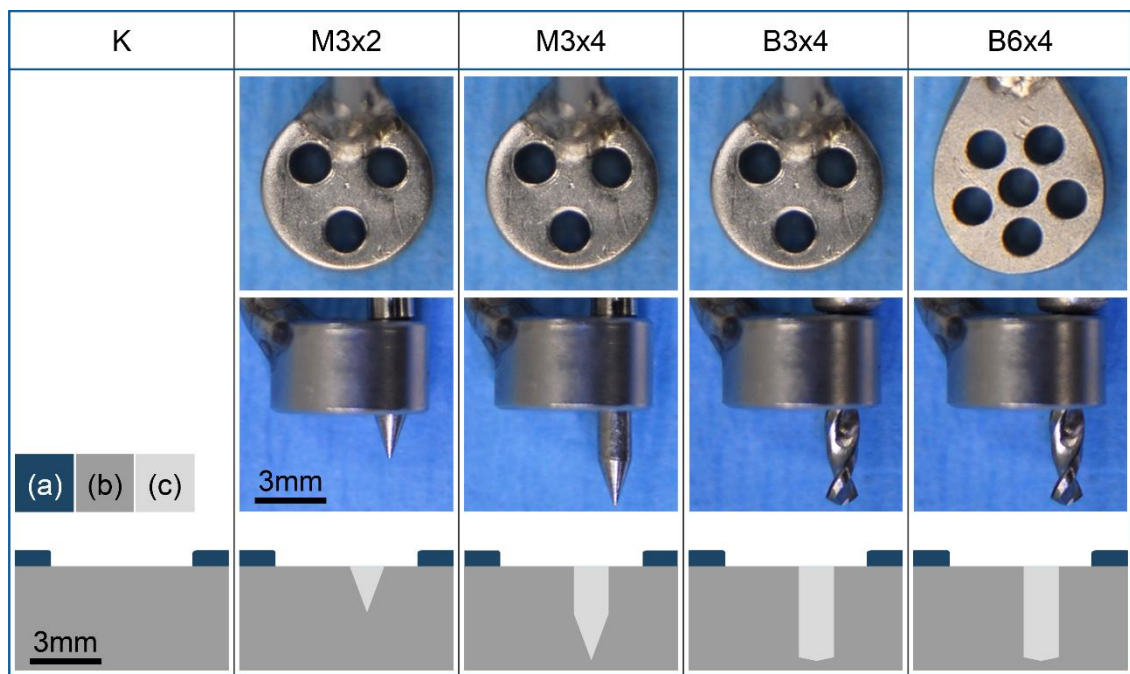


Abbildung 18: Detaillierte Darstellung der verschiedenen Behandlungsmethoden. Obere Reihe: Aufsicht auf die Führungshilfen mit 3 bzw. 6 Löchern, mittlere Reihe: Seitensicht der Führungshilfen mit senkrecht eingebrachten Ahlen und Bohrern, untere Reihe: schematische Darstellung eines Querschnitts durch den mikrofrakturierten Knorpeldefekt. Nativer Knorpel (a), subchondraler Knochen (b), Gewebe im eröffneten Knochen (c).

### 4.1.3 Probengewinnung und Lagerung

Nach einer Standzeit von 12 Monaten wurden die Schafe euthanasiert. In der Literatur wird dies als ausreichend langer Zeitraum für die Bildung und Einheilung von Regeneratknorpel beschrieben (Schneider-Wald et al. 2013). Die Knorpeldefekte wurden zur weiteren Untersuchung jeweils halbiert, sodass je behandeltem Kniegelenk vier quaderförmige Knorpel-Knochen-Stücke entnommen wurden (Abbildung 19). Pro Defekt wurde jeweils ein Probenstück zur biomechanischen Prüfung freigegeben. Dieses wurde direkt nach der Entnahme einzeln verpackt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren.

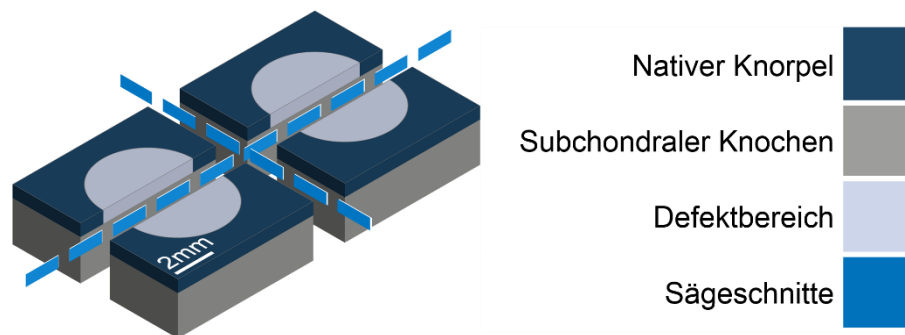


Abbildung 19: Schematische Darstellung der osteochondralen Probenstücke mit jeweils halbkreisförmigem Defektbereich

## 4.2 Bestimmung der quantitativen Defektfüllung

Bei der Probenentnahme wurden von jedem Kniegelenk hochauflösende Fotos aufgenommen, anhand derer anschließend die Bestimmung der prozentualen Defektfüllung erfolgte (Abbildung 20). Zur Bildanalyse wurde das Bildverarbeitungsprogramm ImageJ verwendet. ImageJ ist eine Open-Source-Software, die aufgrund ihrer guten Zugänglichkeit und Modularität weite Verbreitung in der biomedizinischen Analyse von Bildern gefunden hat (Schindelin et al. 2015).

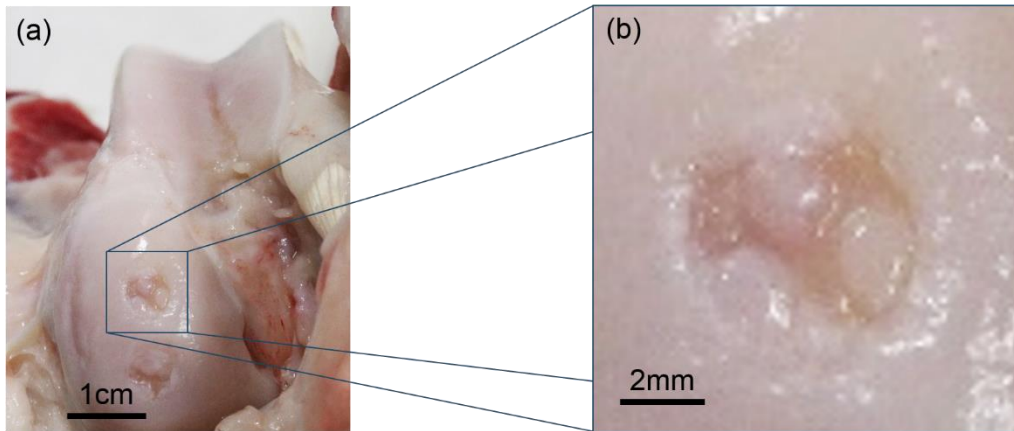


Abbildung 20: Aufnahmen bei Probenentnahme: Übersicht über die mediale Femurkondyle mit zwei teilweise gefüllten Knorpeldefekten (a), Vergrößerte Ansicht des anterioren Defektes mit deutlich sichtbaren Knorpelinseln (b).

In einem ersten Schritt wurde die Fläche des ursprünglichen Knorpelschadens ( $A_S$ ) gemessen (Abbildung 21 a). Im Anschluss daran wurde mit Hilfe eines Schwellwerts und wenigen manuellen Anpassungen der weiterhin nicht gefüllte Bereich des Defektes ( $A_L$ ) ermittelt (Abbildung 21 b und c). Aus beiden Werten lässt sich die prozentuale Füllung des Defektes mit Regeneratgewebe ( $A_R$ ) berechnen (Formel 4).

$$A_R = \frac{1 - A_L}{A_S} \quad [\%] \quad \text{(Formel 4)}$$

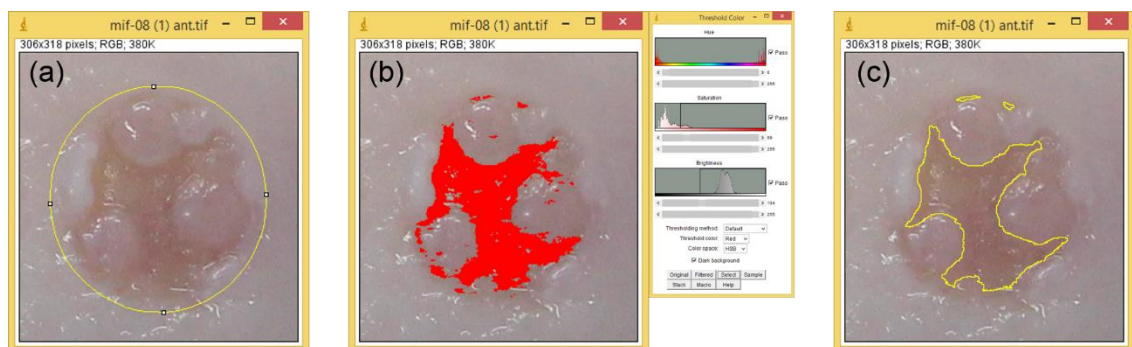


Abbildung 21: Flächenbestimmung mit ImageJ: Manuelle Auswahl der ursprünglichen Defektgröße (a), Auswahl der nicht bedeckten Defektfläche mittels Schwellwert (b), geringe manuelle Optimierung der Schwellwert-Auswahl (c).

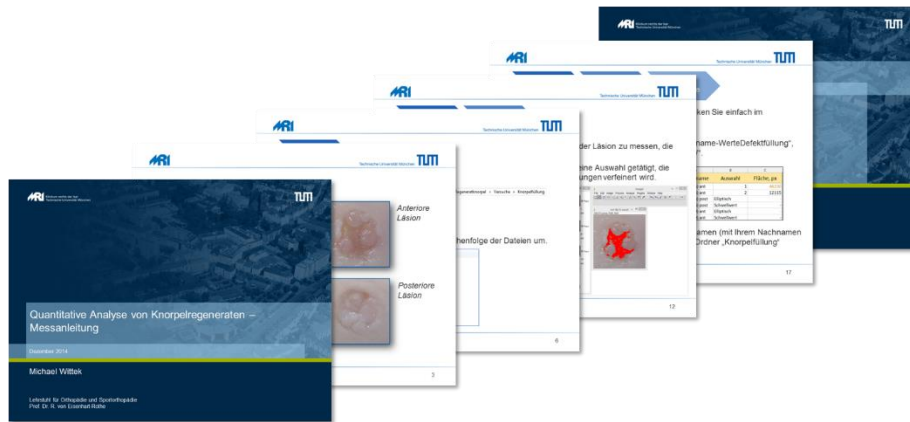


Abbildung 22: Ausschnitt aus der Messanleitung zur Bildanalyse mittels ImageJ

Um die Validität des Messverfahrens zu erhöhen, wurden von jedem Defekt mehrere Bilder aufgenommen ( $\approx 2,33$  Bilder pro Defekt) und die Messung von drei Untersuchern unabhängig voneinander durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine Messanleitung erstellt (Abbildung 22), die den Testern die Handhabung der Software erklärte sowie den Ablauf der Messung standardisieren und erleichtern sollte. Die vollständige Anleitung ist dem Anhang der Arbeit zu entnehmen (Abbildung 40).

### 4.3 Prüfung der biomechanischen Knorpel Eigenschaften

Die biomechanischen Untersuchungen wurden an einem hochdynamischen Prüfsystem durchgeführt mit der Fähigkeit zur Messung von Kräften von unter 5 mN und positionsgeregelten Belastungen mit einer Genauigkeit im Bereich von  $3 \times 10^{-3}$  mm. Die Eingabe des Prüfprotokolls sowie die Ergebnisdarstellung erfolgten individuell für jede Knorpelprobe über eine interaktive Bedienoberfläche (Föhr et al. 2012). Nach Entnahme der tiefgefrorenen Proben aus dem Gefrierschrank wurden diese für 30 Minuten zum Auftauen bei Raumtemperatur in einer phosphat-gepufferten Kochsalzlösung (PBS) belassen. Danach erfolgte die Fixierung der Proben in der ebenfalls mit PBS gefluteten Probenkammer. Um eine senkrechte Ausrichtung zwischen Prüfstempel und Knorpeloberfläche zu gewährleisten, wurde ein spezieller Kipp- und Verschiebe-Tisch mit 4 Freiheitsgraden zusammen mit einem hochauflösenden 2-Kanal-Videosystem verwendet (Abbildung 23).

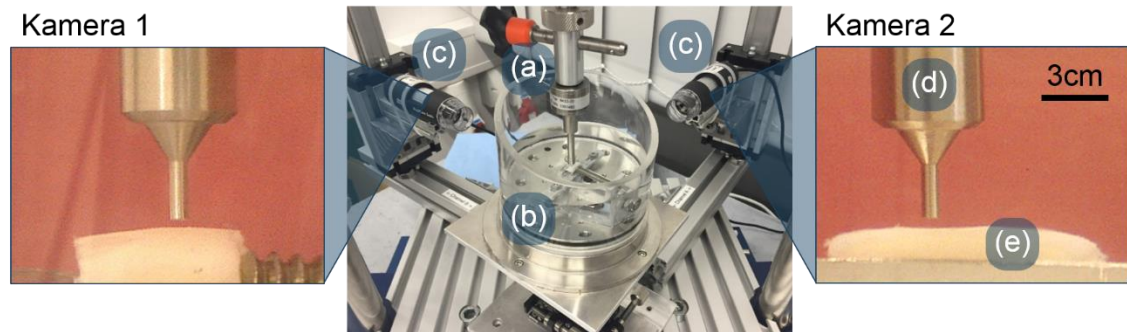


Abbildung 23: Hochdynamisches Prüfsystems mit Kraftaufnehmer (a), Probenkammer mit Einspannhilfe (b) und hochauflösendem Kamerasystem (c). Im Kamerabild werden der zylindrische Indenter (d) und die Knorpelprobe (e) vergrößert dargestellt.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Daten wurden nicht nur die Knorpelregenerate selbst, sondern auch der native Knorpel neben den Defektarealen untersucht. Die Indentation erfolgte jeweils in einem makroskopisch unversehrten Knorpelbereich mit einem Abstand von mindestens doppeltem Indentor-Durchmesser zum Proben- und Defektrand.

#### 4.3.1 Mechanische Dickenmessung

Zu Beginn der biomechanischen Untersuchungen erfolgte jeweils die Bestimmung der Dicke der Knorpelregenerate und des nativen Knorpels. Zur Knorpeldickenmessung wurden in der Literatur bereits neben einer rein optischen Bestimmung Ultraschall-basierte Verfahren und die Nadelindentation beschrieben (Jurvelin et al. 1995). Die optische Vermessung kann nur an einem Querschnitt durch das zu vermessende Gewebe vorgenommen werden (Jurvelin et al. 1987) und kam aus diesem Grund für diese Studie nicht in Frage. Die Ultraschall-basierte Technik beruht auf der Reflektion einer mechanischen Welle an der Tidemark bzw. der Schicht des kalzifizierten Knorpels (Modest et al. 1989; Rushfeldt et al. 1981; Töyräs et al. 2003). Da bei faserknorpelartigen Regeneraten nicht von einer charakteristischen Schichtung des Gewebes mit Ausbildung einer Tidemark auszugehen ist, war diese Methode ebenso ungeeignet zur Untersuchung unserer Proben. Die Nadelindentation ist wiederum ein invasives Messverfahren, bei dem die Probe lokal durch die Nadel zerstört wird (Hoch et al. 1983), was in unserem Fall ebenfalls nicht gewollt gewesen wäre.

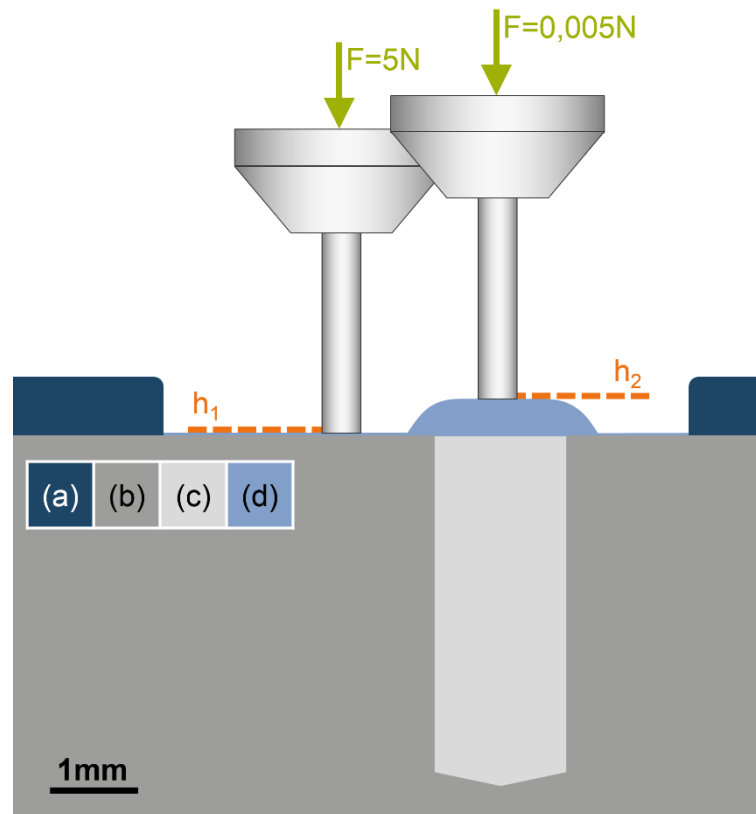


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Knorpeldickenmessung an einer Probe nach Anbohrung des subchondralen Knochens. Nativer Knorpel (a), subchondraler Knochen (b), Gewebe im Bohrloch (c) und neugebildeter Regeneratknorpel (d).

Unter Berücksichtigung der beschriebenen Besonderheiten von Knorpelregeneraten wurde folglich eine neue, mechanische Methode zur Knorpeldickenmessung angewandt (Abbildung 24). Diese bestand aus drei Schritten:

1. Belastung des freiliegenden Knochens neben dem Regeneratknorpel mit einer hohen Anpresskraft von 5 N und Ablesen der Position  $h_1$
2. Anfahren der Oberfläche des Knorpelregenerates mit einem sehr geringen Kraft-Trigger von 0,005 N und Ablesen der Position  $h_2$
3. Berechnung der Knorpeldicke  $h$  aus der Differenz der beiden Höhen  $h_1$  und  $h_2$

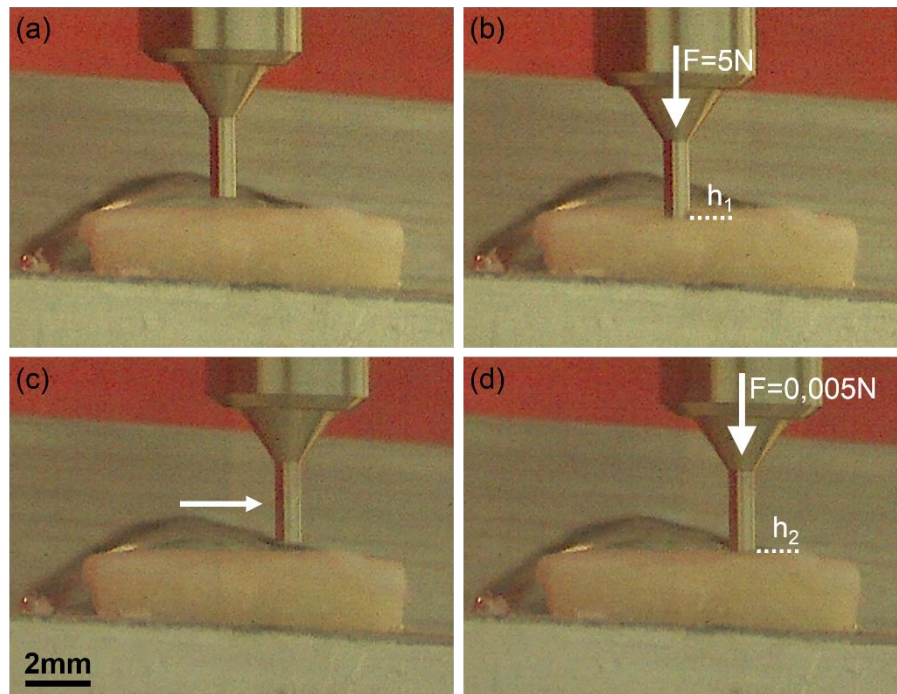


Abbildung 25: Aufnahmen einer mechanischen Knorpeldickenmessung: Senkrechte Ausrichtung des Prüfstempels ( $d = 0,8 \text{ mm}$ ) zur Probenoberfläche (a), Belastung des Knochens (b), horizontale Verschiebung der Probenkammer (c) und Anfahren des Knorpelregenerates (d).

Für die Dickenmessung wurde ein zylindrischer Indenter mit einem Durchmesser  $d = 0,8 \text{ mm}$  verwendet (Abbildung 25). Durch die hohe Kraft von  $5 \text{ N}$  mit der die Position auf dem Knochen ( $h_1$ ) angefahren wurde, konnte sichergestellt werden, dass möglicherweise vorhandenes Knorpelgewebe an dieser Stelle maximal komprimiert und folglich die Knochenoberfläche gemessen wurde. Im Gegensatz dazu wurde für die Bestimmung der Höhe des Knorpelregenerates ( $h_2$ ) mit nur  $5 \text{ mN}$  ein sehr geringer Kraft-Trigger verwendet, der schon bei Kontakt mit weichstem Gewebe auslöste.

#### 4.3.2 Stufenweise Indentation

Die Knorpelindentation wurde in Anlehnung an den von Töyräs et al. beschriebenen Stufenversuch durchgeführt, der von den Autoren zur Charakterisierung enzymatisch degradierten Rinderknorpels vorgestellt wurde (Töyräs et al. 1999). Zur Messung wurde ein solider, zylindrischer Indenter mit einem Durchmesser von  $d = 0,8 \text{ mm}$  verwendet.

##### Versuchsprotokoll

Die stufenweise Indentation erfolgte in 15 Schritten bis zu einer maximalen Dehnung von  $40\%$  (zunächst 10 Schritte à  $2\%$  Dehnung, im Anschluss 5 Schritte à  $4\%$  Dehnung). Die Kompressionsschritte wurden mit einer Geschwindigkeit von  $1,0 \text{ mm/min}$  realisiert. Die vorgegebene Relaxationszeit betrug jeweils  $100 \text{ s}$  (Abbildung 26).

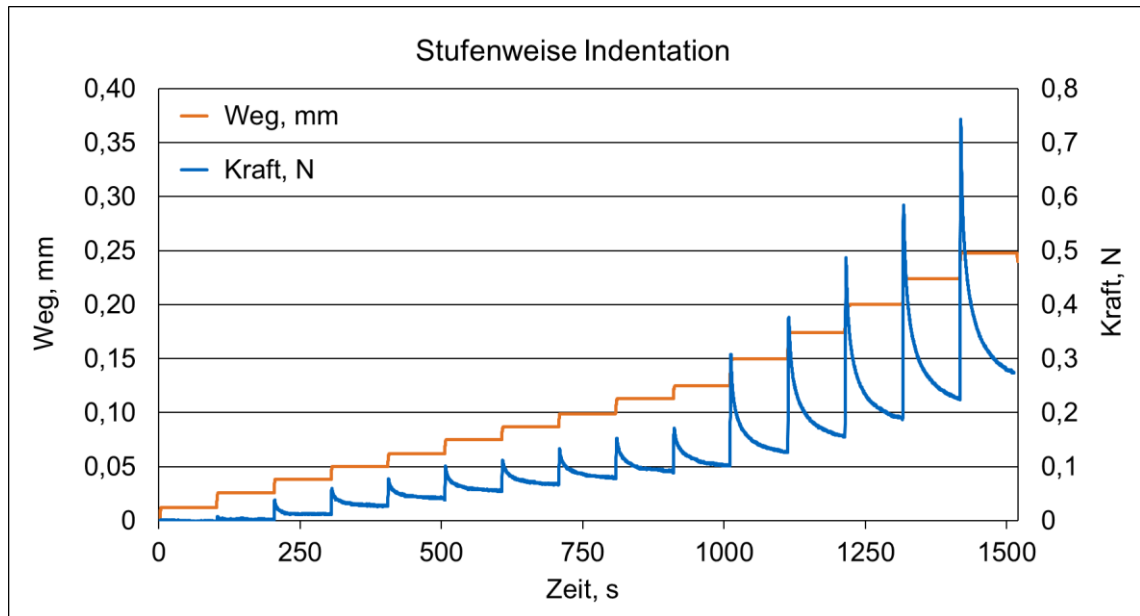


Abbildung 26: Stufenweise Stress-Relaxation: Vorgegebener stufenförmiger Weg und gemessene resultierende Kraft im Zeitverlauf

Berechnung des Elastizitätsmoduls aus der Spannung im Equilibrium

Aus den jeweils am Ende der Relaxationsphase gemessenen Kräften im Equilibrium  $F_{equil}$  wurde für jeden Einzelschritt die Spannung  $\sigma$  berechnet (Abbildung 27). Wird diese gegenüber der Dehnung aufgetragen, ergibt sich aus der Steigung der Regressionsgeraden im linearen Bereich der Elastizitätsmodul  $E_{measured}$ .

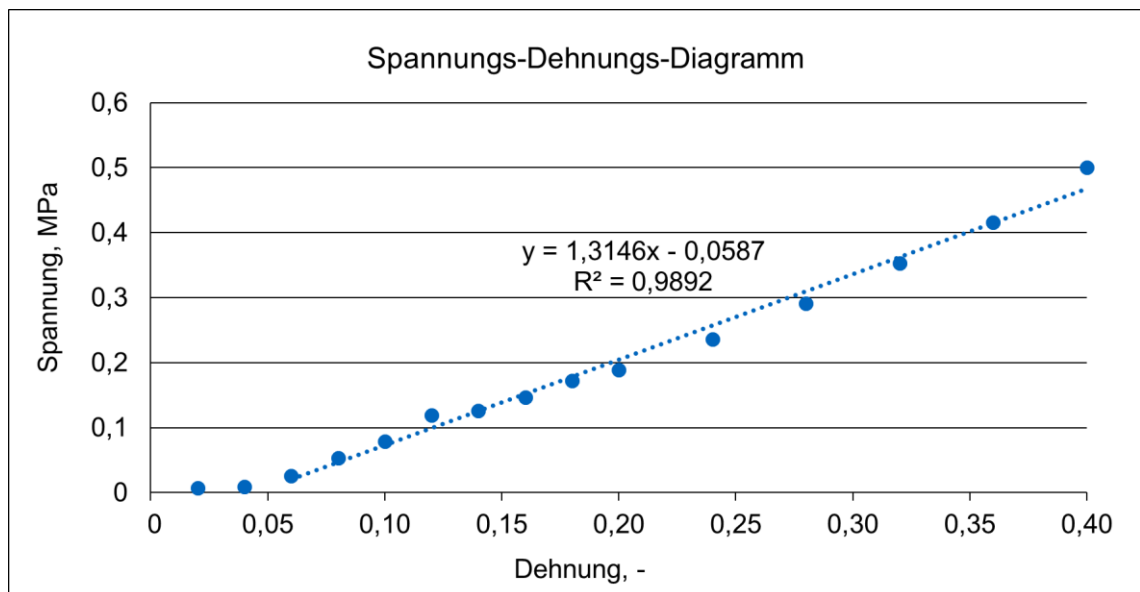


Abbildung 27: Spannungs-Dehnungs-Diagramm der stufenweisen Indentation und Bestimmung des E-Moduls  $E_{measured} = 1,3146$  MPa. Die Regressionsgerade gilt für den Bereich von 6 - 40% Dehnung und besitzt in dieser Berechnung einen Korrelationskoeffizienten von  $R^2 = 0,9892$ .



Der endgültige Elastizitätsmodul  $E$  wurde mit der von Töyräs et al. beschriebenen Gleichung (Formel 5) berechnet (Töyräs et al. 1999).

$$E = E_{measured} * \left( \frac{\pi a}{2h\kappa} (1 - \nu^2) \right) \quad (\text{Formel 5})$$

Mit

$E_{measured}$	Steigung der Regressionsgeraden im linearen Bereich des Spannungs-Dehnungs-Diagramms
$a$	Radius des Indentors
$h$	Knorpeldicke
$\kappa$	Skalierungsfaktor
$\nu$	Poisson's ratio

Es wurde stets der identische Indentor mit Radius  $a = 0,4$  mm verwendet. Außerdem wurde für alle Messungen die Poisson's ratio mit  $\nu = 0,1$  angenommen (nach Jurvelin et al. 1997). Die Bestimmung der Knorpeldicke  $h$  erfolgte für jede Probe einzeln (vgl. Kapitel 4.3.1). Da der Skalierungsfaktor  $\kappa$  unter anderem von der Knorpeldicke, dem Indentorradius und der Indentationstiefe abhängig ist, wurde er für jede Messung individuell ermittelt. Zhang et al. haben zu diesem Zweck eine Wertetabelle erarbeitet und vorgeschlagen die dazwischenliegenden Werte mittels linearer Interpolation zu berechnen (Zhang et al. 1997). Aufgrund des eingeschränkten Wertebereiches von  $\kappa$   $W(\kappa) = [1,209; 3,999]$  mussten zwei Messungen verworfen werden, für die sich der Skalierungsfaktor  $\kappa$  nicht berechnen ließ. Betroffen waren Messungen der Gruppe 2 (M3x2) und der Gruppe 5 (B6x4), sodass sich in diesen Gruppen der Stichprobenumfang für die Berechnung des Elastizitätsmoduls  $E$  jeweils auf  $n = 11$  reduzierte.

#### Verhältnis der Spitzenkräfte zu den Kräften im Equilibrium

Bei jeder Kompressionsstufe wird initial eine Spitzenkraft  $F_{peak}$  gemessen, die dann wie beschrieben nachlässt (vgl. Kapitel 2.1.2) und in die Kraft im Gleichgewicht  $F_{equil}$  übergeht (Abbildung 28). Das Verhältnis  $F_{peak}/F_{equil}$  wurde jeweils für die Schritte 7 bis 9 (entsprechend 14%, 16% und 18% Dehnung) bestimmt und gemittelt. Wurde in einzelnen Fällen die vorgegebene Dehnung nicht unmittelbar zu Beginn der Indentationsstufe realisiert, so wurde dieser Schritt aus der Messung ausgeschlossen, um Verfälschungen der Spitzenkräfte zu vermeiden.

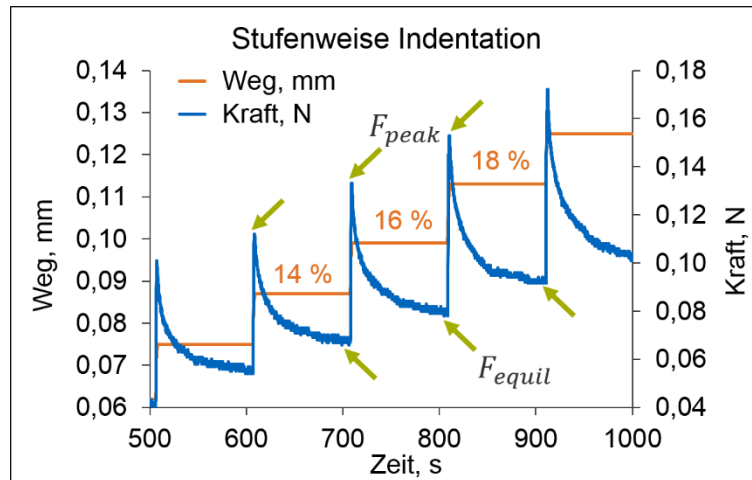


Abbildung 28: Ausschnitt aus dem Stufenversuch (Schritte 6 – 10) mit Darstellung der Spitzenkräfte und Kräfte im Equilibrium bei 14%, 16% und 18% Dehnung

#### 4.4 Statistische Analyse

Zur Datenerfassung, -verarbeitung und -sicherung wurde Microsoft Excel 2013 verwendet (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA).

Zunächst wurden die Daten nach Ausreißern durchsucht. GraphPad Prism bietet hierfür eine automatisierte Identifizierung und Eliminierung einzelner Werte, die deutlich von der Gesamtheit der Werte abweichen, an. Diese sogenannte ROUT-Methode (Robust regression and Outlier removal) demaskiert Ausreißer mit Hilfe nichtlinearer Kurvenanpassungen. Sie besitzt dabei eine angemessene Power und liefert nur wenige falsch positive Ergebnisse (Motulsky und Brown 2006). Für den ROUT-Koeffizient Q wurde wie in der Literatur empfohlen  $Q = 1$  gewählt, was einer moderaten, aber effektiven Eliminierung von Ausreißern entspricht. Werte, die mit dieser Methode ausgeschlossen wurden, werden bei der Ergebnisdarstellung im Einzelnen hervorgehoben.

Zur statistischen Analyse der Daten aus den unterschiedlichen Behandlungsgruppen wurde jeweils eine einfaktorische Varianzanalyse (one-way ANOVA) mit Tukey-Test *post-hoc* durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede werden einheitlich kenntlich gemacht (Tabelle 5).

Tabelle 5: Einheitlich verwendete Kennzeichnung statistischer Signifikanzen

Symbol	*	**	***
Bedeutung	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.01$	$p \leq 0.001$

## 5 Ergebnisse

Zunächst wird die makroskopische Beurteilung der Knorpelproben dargestellt, gefolgt von den Ergebnissen der quantitativen Defektfüllung sowie der biomechanischen Prüfung. Zur eindrücklichen Visualisierung der Daten werden Balkendiagramme verwendet, die Mittelwert und Standardabweichung ( $MW \pm SA$ ) der jeweiligen Behandlungsgruppen bzw. des nativen Knorpels repräsentieren. Alle statistisch signifikant unterschiedlichen Ergebnisse werden einheitlich gekennzeichnet (Tabelle 5). Die einzelnen Messwerte sind der Übersichtlichkeit halber nicht im Fließtext der Arbeit enthalten, sondern gesondert im Anhang aufgelistet (Tabelle 10, Tabelle 11).

### 5.1 Makroskopische Beurteilung der Gewebeproben

Alle 33 Merinoschafe befanden sich während der 12-monatigen Standzeit in einem guten Gesundheitszustand. Sie zeigten keine Auffälligkeiten im Bereich des Operationsgebietes. Bei Entnahme der Knorpelproben erfolgte zunächst eine makroskopische Beurteilung und fotografische Dokumentation der Behandlungsergebnisse (Abbildung 30 - 34). Mehrere Knorpelproben ließen einen Rückschluss auf die Anzahl der Perforationen im Defektbereich zu, da das Ersatzgewebe regelrechte Inseln im Bereich der Perforationen gebildet hatte (Abbildungen 31b/d/e, 33a/b, 34e). Unter dem Auflichtmikroskop war dies besonders eindrücklich zu erkennen. Außerdem konnte man sporadisch Gewebe aus dem umgrenzenden Knorpel erkennen, welches zungenförmig ohne feste Verbindung zum Knochen in den Defektbereich überhing (Abbildung 29). Insgesamt war das makroskopische Bild der Proben aber sehr uneinheitlich. Von fast leeren bis nahezu vollständig gefüllten Defekten konnte alles beobachtet werden.

Eine Ausnahme stellten die unbehandelten Leerkontrollen dar (Abbildung 30). Hier konnte allenfalls ein geringes Einwachsen von Knorpel aus dem den Defekt umfassenden Bereich beobachtet werden. In keinem Fall konnte der Knorpelschaden auf diese Weise auch nur annähernd gefüllt werden. Es konnte folglich bestätigt werden, dass es sich bei der Größe des gesetzten Knorpelschadens mit Durchmesser  $d = 6$  mm um eine kritische Defektgröße handelte, die zu keiner Selbstregeneration fähig war (Schneider-Wald et al. 2013).

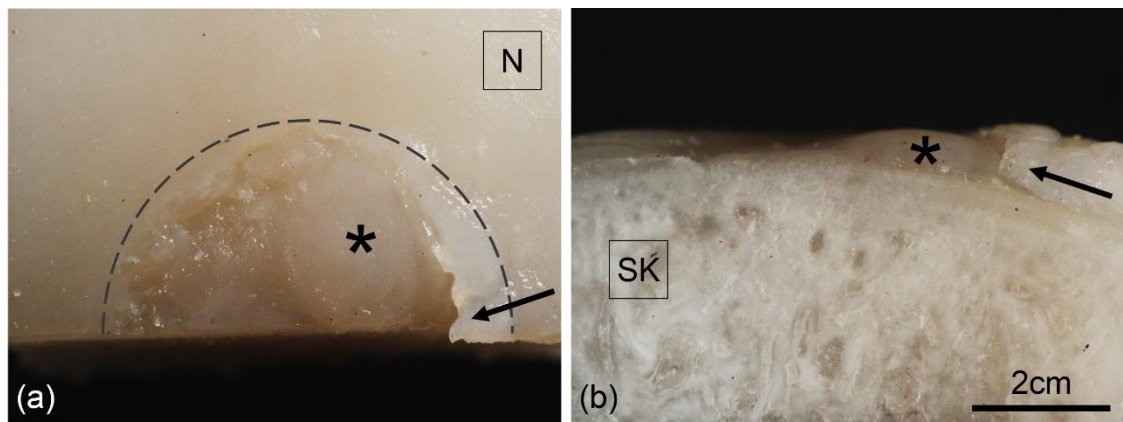


Abbildung 29: Fotografische Aufnahme einer Knorpelprobe der Gruppe B3x4 unter dem Auflichtmikroskop (TUM-Code: mif33). In der Ansicht von oben (a) ist der ursprüngliche Defektbereich durch den gestrichelten Halbkreis angedeutet. Umgebend ist der native Knorpel (N) zu sehen. In der Seitensicht mit Schnittführung durch die Defektmittelpunkt (b) sind eine typische Insel aus Regeneratknorpel (\*) und der subchondrale Knochen (SK) abgebildet. Der Pfeil markiert das aus dem umliegenden Knorpelbereich überhängende Gewebe ohne feste Verbindung zum subchondralen Knochen.

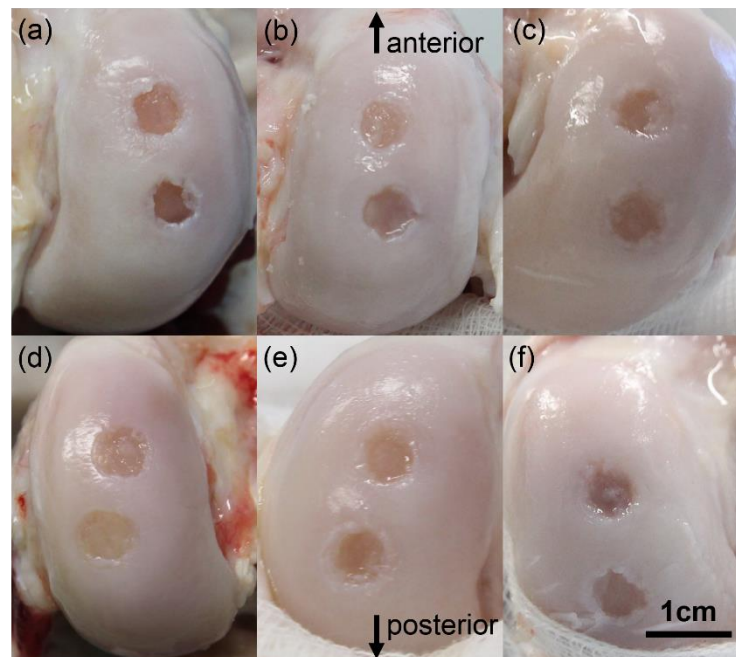


Abbildung 30: Übersicht über die medialen Femurkondylen der unbehandelten Leerkontrollen nach 12 Monaten Standzeit. Beschriftung zur Probenidentifikation: (a) mif-06, (b) mif-04, (c) mif-01, (d) mif-05, (e) mif-03, (f) mif-02.

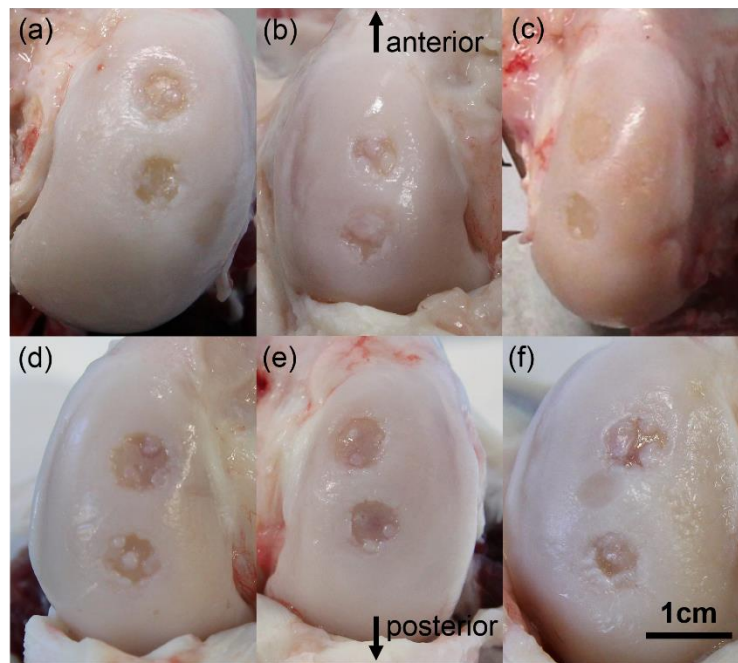


Abbildung 31: Übersicht über die medialen Femurkondylen der Behandlungsgruppe M3x2 nach 12 Monaten Standzeit. Beschriftung zur Probenidentifikation: (a) mif-19, (b) mif-20, (c) mif-21, (d) mif-22, (e) mif-23, (f) mif-24.

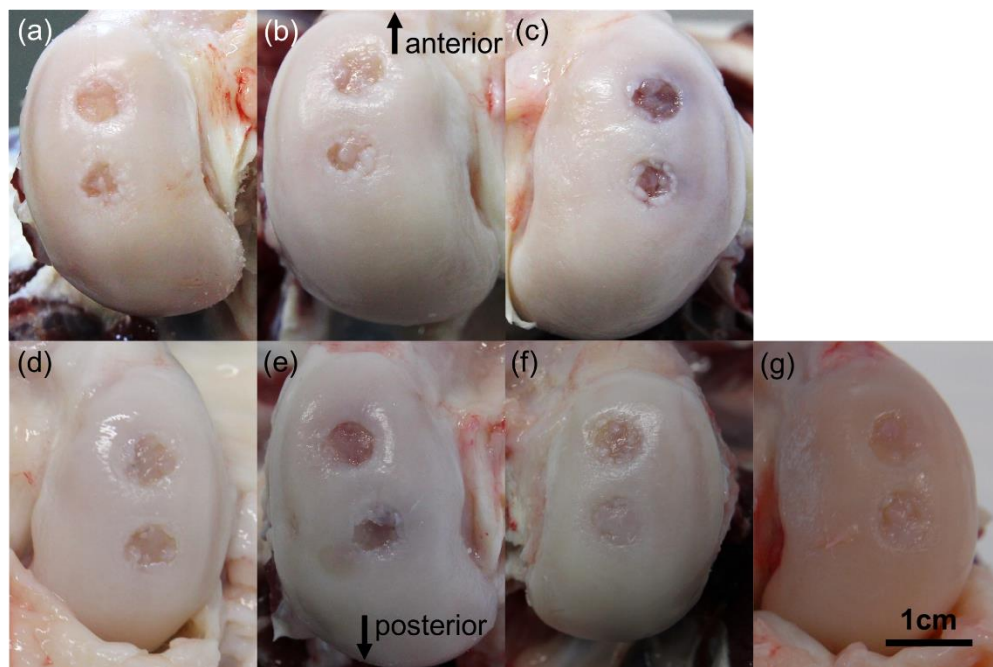


Abbildung 32: Übersicht über die medialen Femurkondylen der Behandlungsgruppe M3x4 nach 12 Monaten Standzeit. Beschriftung zur Probenidentifikation: (a) mif-12, (b) mif-13, (c) mif-15, (d) mif-16, (e) mif-17, (f) mif-18, (g) mif-31.

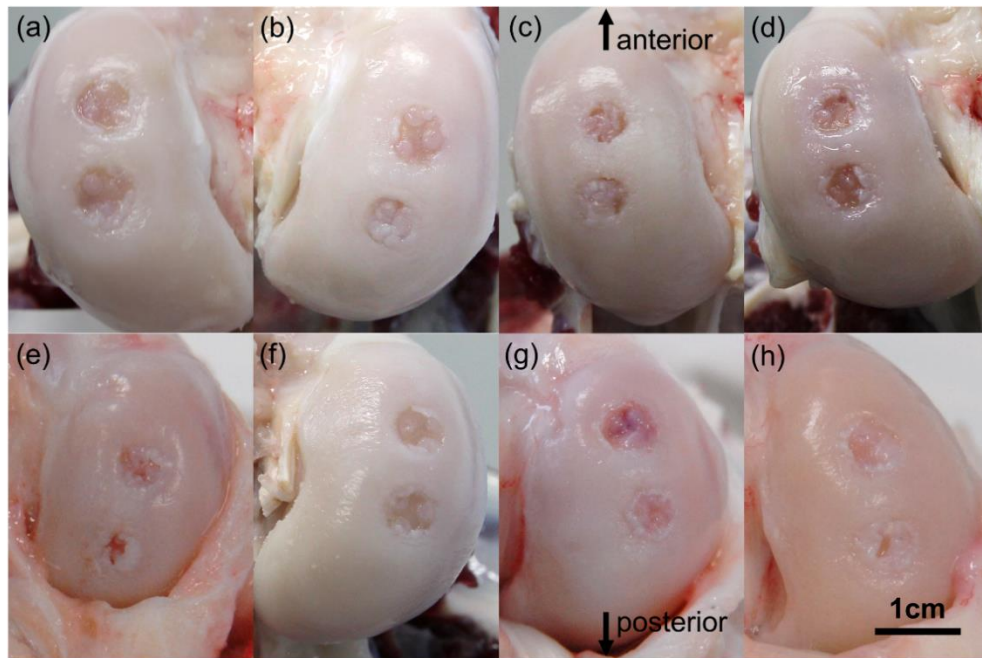


Abbildung 33: Übersicht über die medialen Femurkondylen der Behandlungsgruppe B3x4 nach 12 Monaten Standzeit. Beschriftung zur Probenidentifikation: (a) mif-07, (b) mif-08, (c) mif-09, (d) mif-10, (e) mif-11, (f) mif-14, (g) mif-32, (h) mif-33.

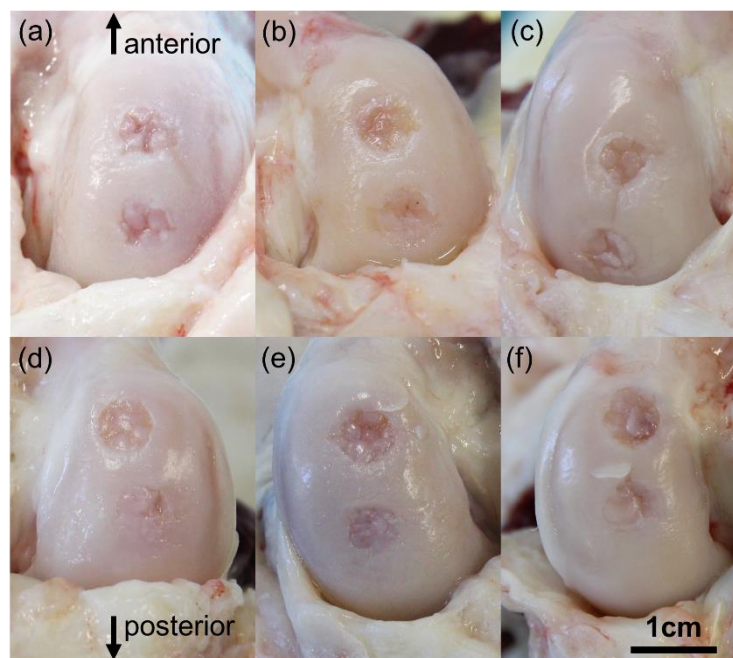


Abbildung 34: Übersicht über die medialen Femurkondylen der Behandlungsgruppe B6x4 nach 12 Monaten Standzeit. Beschriftung zur Probenidentifikation: (a) mif-25, (b) mif-26, (c) mif-27, (d) mif-28, (e) mif-29, (f) mif-30.

Makroskopisch ließ sich bei keiner der entnommenen Proben ein Dickenwachstum der Regenerate über das Niveau des nativen Knorpels hinaus feststellen. Des Weiteren zeigte sich der subchondrale Knochen soweit beurteilbar stets intakt, der umliegende native Knorpel unauffällig.

## 5.2 Ergebnisse der quantitativen Defektfüllung

Die quantitative Defektfüllung stellt den relativen Anteil der Fläche des ursprünglichen Knorpeldefektes dar, der nach 12 Monaten Standzeit mit regenerativem Ersatzgewebe bedeckt wurde. Sie wird in Prozentwerten in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe zusammen mit dem Stichprobenumfang der jeweiligen Gruppe angegeben (Tabelle 6, Abbildung 35).

*Tabelle 6: Mittelwerte der prozentualen Defektfüllung [%] mit Standardabweichung und Stichprobenumfang in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe.*

Behandlungsgruppe	Defektfüllung, % (MW $\pm$ SA)	Stichprobenumfang
M3x2	64,8 $\pm$ 13,5	n = 12
M3x4	70,7 $\pm$ 11,4	n = 14
B3x4	77,9 $\pm$ 11,7	n = 16
B6x4	84,2 $\pm$ 6,6	n = 12
Leerkontrollen	45,8 $\pm$ 8,2	n = 12

Die Analyse der Messwerte mit der ROUT-Methode stellte keine Ausreißer innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen fest, sodass stets der vollständige Stichprobenumfang in die Statistik einbezogen werden konnte (vgl. Kapitel 4.4). Unabhängig von der Art der Defektbehandlung zeigten alle knochenmarkstimulierten Knorpelproben eine statistisch signifikant höhere Defektfüllung als die unbehandelten Leerkontrollen ( $p \leq 0.001$ ). Mit einer durchschnittlichen Defektfüllung von 84,2%  $\pm$  6,6% (MW  $\pm$  SA) erreichte die Gruppe B6x4 mit 6 gebohrten Löchern die höchsten Werte. Bei dieser Behandlungsgruppe wurde eine statistisch signifikant höhere Defektfüllung als bei beiden mikrofrakturierten Gruppen erreicht (B6x4 vs. M3x2:  $p \leq 0.001$ ; B6x4 vs. M3x4:  $p \leq 0.05$ ). Weiterhin waren die Defekte der Gruppe B3x4 signifikant mehr gefüllt mit Regeneratgewebe als diejenigen der mikrofrakturierten Gruppe mit 2 mm Eindringtiefe M3x2 (B3x4 vs. M3x2:  $p \leq 0.05$ ). Die Gruppe M3x2 erreichte mit einer Defektfüllung von 64,8%  $\pm$  13,5% (MW  $\pm$  SA) die niedrigsten Werte und lag damit 19,4% unter dem Spitzenreiter B6x4.

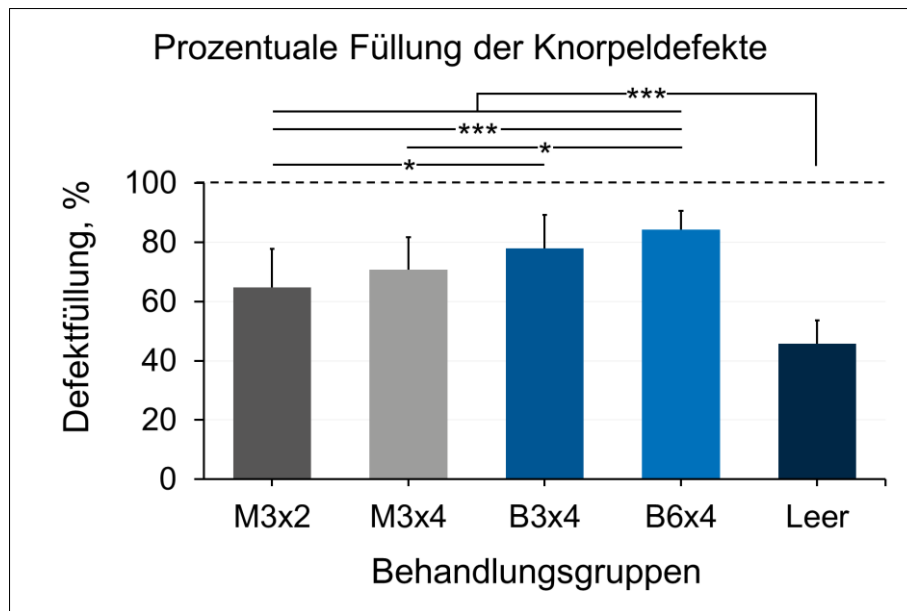


Abbildung 35: Prozentuale Füllung der Knorpeldefekte (MW ± SA) in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe

### 5.3 Ergebnisse der mechanischen Dickenmessung

Zur Berechnung der dehnungsabhängigen Indentationsstufen wurde die lokale Dicke des Regeneratknorpels der verschiedenen Behandlungsgruppen und des nativen Knorpels bestimmt (Tabelle 7, Abbildung 36). Bei Analyse der Dickenwerte mit der ROUT-Methode (vgl. Kapitel 4.4) wurde innerhalb der Gruppe B3x4 ein Ausreißer identifiziert und folglich von den weiteren Berechnungen ausgeschlossen.

Tabelle 7: Mittelwerte der lokalen Knorpeldicken [mm] mit Standardabweichung und Stichprobenumfang in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe. # markiert die Anzahl der Ausreißer innerhalb der Gruppe.

Behandlungsgruppe	Knorpeldicke, mm (MW ± SA)	Stichprobenumfang
Nativer Knorpel	0,669 ± 0,249	n = 33
M3x2	0,429 ± 0,210	n = 12
M3x4	0,533 ± 0,236	n = 14
B3x4	0,559 ± 0,168	n = 15 # <sup>1</sup>
B6x4	0,490 ± 0,221	n = 12



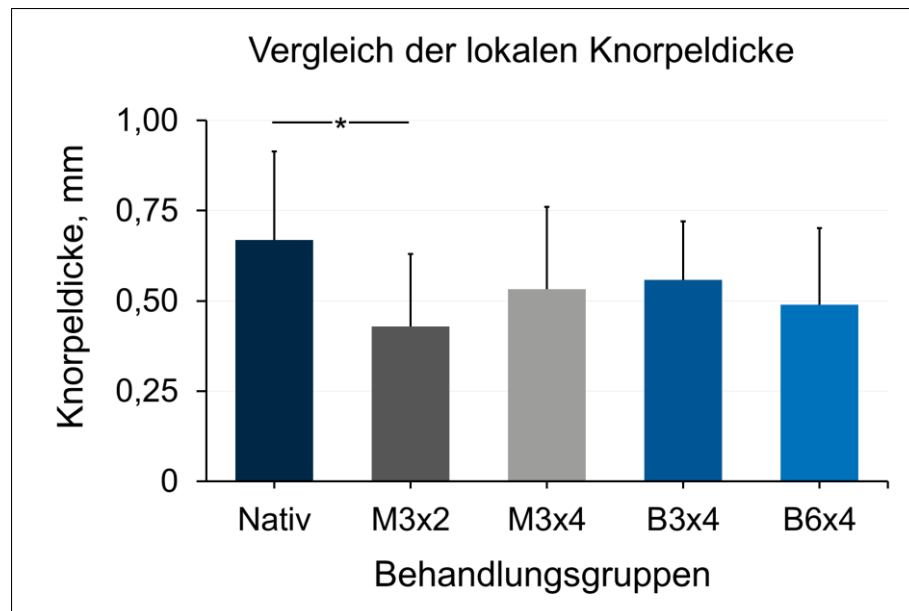


Abbildung 36: Vergleich der lokalen Knorpeldicke (MW ± SA) in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe

In der Behandlungsgruppe M3x2 fällt die durchschnittliche Dicke des regenerativen Gewebes mit  $d = 0,429 \pm 0,210$  mm (MW ± SA) signifikant geringer aus als bei dem nativen Knorpel (M3x2 vs. Nativ:  $p \leq 0,05$ ). Das Ersatzgewebe der Gruppen M3x4, B3x4 und B6x4 ist tendenziell ein wenig dünner als der benachbarte native Knorpel. Diese Unterschiede besitzen allerdings keine statistische Signifikanz. Ebenso unterscheiden sich die Behandlungsgruppen selbst nicht statistisch signifikant voneinander.

#### 5.4 Ergebnisse der stufenweisen Indentation

Bei dem Indentationsversuch wurden die Proben in einheitlichen Stufen Dehnungen bis zu 40% ausgesetzt (10 Stufen à 2% Dehnung gefolgt von 5 Stufen à 4% Dehnung). Zum Erreichen dieser einheitlichen Dehnungsstufen wurde bei jeder Knorpelprobe ein individueller, vertikaler Positionsversatz des Indentors vorgegeben. Für eine 2%ige Dehnung betrug dieser Weg 12,7 µm bei der Gruppe Nativ, 8,6 µm bei M3x2, 9,1 µm bei M3x4, 11,9 µm bei B3x4 und 9,3 µm bei B6x4 (Angaben entsprechen dem Median).

Auf jeder Indentationsstufe wurde die dehnungsabhängige Spannung im Gleichgewichtszustand bzw. Equilibrium gemessen. Im weiteren Verlauf wurde zur Berechnung des Elastizitätsmoduls die Steigung im linearen Bereich des Spannungs-Dehnungs-Diagramms ermittelt. Hierfür erfolgte die automatisierte Berechnung einer Regressionsgeraden durch Microsoft Excel. Um die Genauigkeit dieser Berechnung objektivieren zu können, wurde zusätzlich der Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden von Microsoft Excel dokumentiert. Bei Werten von R-Quadrat über

80% wird von einer guten Kurvenanpassung gesprochen. In unseren Berechnungen konnten Korrelationskoeffizienten von  $98,7\% \pm 1,1\%$  bei Nativ,  $95,9\% \pm 3,9\%$  bei M3x2,  $97,3\% \pm 2,6\%$  bei M3x4,  $96,1\% \pm 2,8\%$  bei B3x4 und  $97,3\% \pm 1,6\%$  bei B6x4 (MW  $\pm$  SA) erzielt werden.

*Tabelle 8: Mittelwerte der Elastizitätsmoduln [MPa] mit Standardabweichung und Stichprobenumfang in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe. # markiert die Anzahl der Ausreißer innerhalb der Gruppe.*

Behandlungsgruppe	Elastizitätsmoduln, MPa (MW $\pm$ SA)	Stichprobenumfang
Nativer Knorpel	$0,63 \pm 0,34$	n = 33
M3x2	$0,16 \pm 0,17$	n = 9 <sup>#2</sup>
M3x4	$0,17 \pm 0,18$	n = 13 <sup>#1</sup>
B3x4	$0,71 \pm 0,39$	n = 16
B6x4	$0,66 \pm 0,38$	n = 11

Ausgehend von den Rohwerten konnte schließlich bei 85 von 87 Messungen der Elastizitätsmodul bestimmt werden (vgl. Kapitel 4.3.2). Durch die Identifikation und Eliminierung von zwei Ausreißern in der Gruppe M3x2 und einem Ausreißer in der Gruppe M3x4 verringerte sich der Stichprobenumfang in diesen Kategorien nochmals geringfügig. Mit einer Größe von n = 9 stellte die Behandlungsgruppe M3x2 damit die kleinste Anzahl an Werten für den Elastizitätsmodul (Tabelle 8).

Der Elastizitätsmodul des nativen Knorpels und die Elastizitätsmoduln der mit Anbohrung behandelten Knorpelproben unterscheiden sich nicht statistisch signifikanten voneinander (Abbildung 37). Signifikant unterschiedliche Ergebnisse konnten dagegen zwischen Nativ und M3x2 ( $p \leq 0.01$ ) sowie zwischen Nativ und M3x4 ( $p \leq 0.001$ ) festgestellt werden. Betrachtet man die Bohrungen gegenüber den Mikrofrakturierungen, erreichten sowohl B3x4 als auch B6x4 einen signifikant höheren Elastizitätsmodul als jeweils M3x2 und M3x4 (B3x4 vs. M3x2:  $p \leq 0.01$ ; B3x4 vs. M3x4:  $p \leq 0.001$ ; B6x4 vs. M3x2:  $p \leq 0.01$ , B6x4 vs. M3x4:  $p \leq 0.01$ ). Die zwei mit Anbohrung behandelten Gruppen unterschieden sich hinsichtlich des E-Moduls nicht signifikant voneinander.

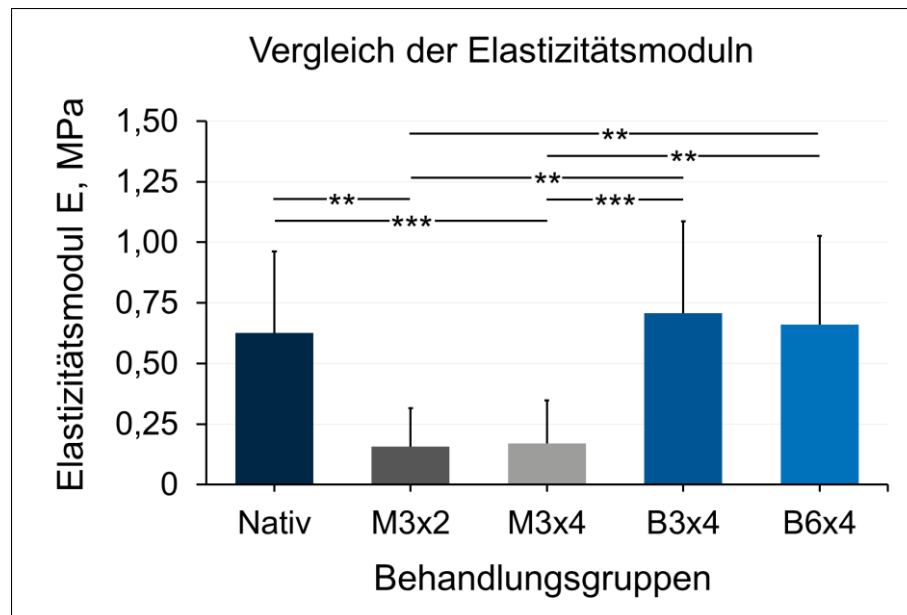


Abbildung 37: Vergleich der Elastizitätsmoduln (MW ± SA) in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe

Im stufenweisen Indentationsversuch wurde für jede Untersuchungsgruppe neben dem E-Modul zusätzlich das Verhältnis der Spitzenkräfte zu den Kräften im Equilibrium berechnet (Abbildung 38). Die Bestimmung erfolgte für die Indentationsstufen 7, 8 und 9 entsprechend 14%, 16% und 18% Dehnung (vgl. Kapitel 4.3.2). Auch diese Daten wurden wiederum mit der ROUT-Methode nach Ausreißern durchsucht, was zum Ausschluss von einem Messwert der Gruppe Nativ und zwei Messwerten der Gruppe M3x4 führte (Tabelle 9).

Tabelle 9: Mittelwerte der Kräfteverhältnisse [N/N] mit Standardabweichung und Stichprobenumfang in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe. # markiert die Anzahl der Ausreißer innerhalb der Gruppe.

Behandlungsgruppe	Verhältnis der Spitzenkräfte zu den Kräften im Equilibrium, N/N (MW ± SA)	Stichprobenumfang
Nativer Knorpel	1,72 ± 0,25	n = 32 <sup>#1</sup>
M3x2	1,99 ± 0,83	n = 12
M3x4	1,75 ± 0,44	n = 12 <sup>#2</sup>
B3x4	2,99 ± 1,41	n = 16
B6x4	2,66 ± 0,86	n = 12

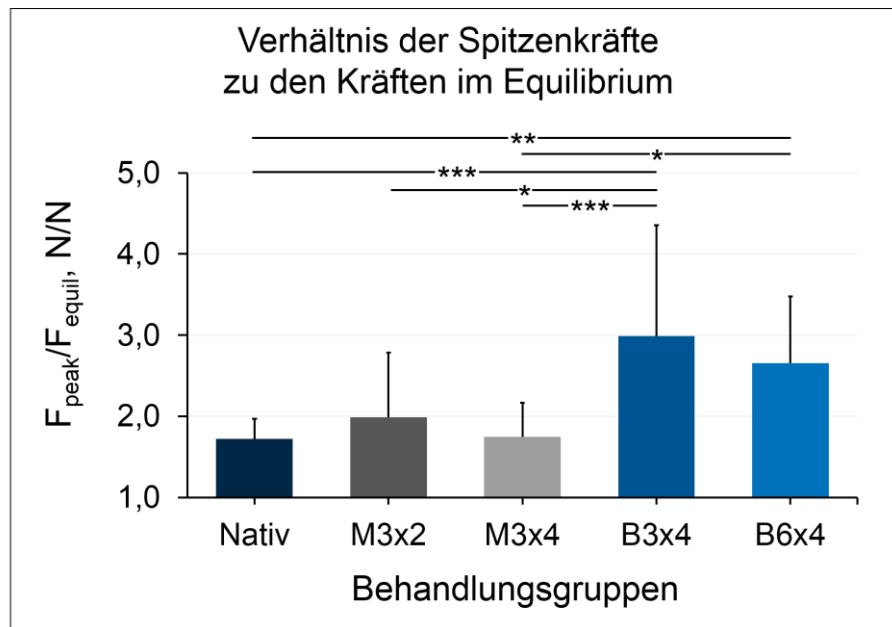


Abbildung 38: Verhältnis der Spitzenkräfte zu den Kräften im Equilibrium (MW  $\pm$  SA) in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe

Die Kräfteverhältnisse von nativem Knorpel, M3x2 und M3x4 unterschieden sich nicht signifikant voneinander. In diesem Fall wichen die mit Anbohrung behandelten Knorpelproben von den restlichen Gruppen ab. In der Behandlungsgruppe B6x4 wurden verhältnismäßig höhere Spitzenkräfte gemessen als in den Gruppen M3x4 und Nativ (B6x4 vs. M3x4:  $p \leq 0.05$ ; B6x4 vs. Nativ:  $p \leq 0.01$ ). Gleiches galt für die Gruppe B3x4, wobei diese zusätzlich auch noch signifikant höhere Werte als M3x2 annahm (B3x4 vs. Nativ:  $p \leq 0.001$ ; B3x4 vs. M3x2:  $p \leq 0.05$ ; B3x4 vs. M3x4:  $p \leq 0.001$ ).

## 6 Diskussion

### 6.1 Präklinisches Tiermodell

Bei dem untersuchten präklinischen Tiermodell wurde auf eine hohe Übertragbarkeit des vorliegenden Krankheitsbilds und der Behandlungsmethoden auf den Menschen geachtet. Aufgrund der Analogie zur humanen Anatomie eignen sich bestimmte Großtierspezies wie die Ziege, das Schwein oder das Schaf gut für die präklinische Forschung an Knorpelregeneraten. Der mit etwa 42% größte Teil dieser Studien wird, wie auch in unserem Fall, am Schaf realisiert (Schneider-Wald et al. 2013). Osterhoff et al. beschreiben das ovine Kniegelenk als ein geeignetes Modell für das humane Gegenstück, das im Bereich der medialen Femurkondyle basierend auf den knöchernen Verhältnissen als um ein Drittel verkleinert anzusehen sei (Osterhoff et al. 2011). Ein weiteres Kriterium bei der Wahl des Tiermodells ist die biologische Regenerationsfähigkeit der Spezies. Der für die Knorpelregeneration wichtige subchondrale Knochen weist beim Schaf eine dickere subchondrale Platte auf als beim Menschen (Chevrier et al. 2015). Trotzdem wird in der Literatur von einer vergleichbaren Regenerationsfähigkeit des Schafes berichtet (Schneider-Wald et al. 2013). Entscheidend ist darüber hinaus auch das Alter der Tiere, da junge, im Wachstum befindliche Tiere ein größeres Regenerationspotential aufweisen als alte Tiere. Folglich müssen Studien, die auf erwachsene Menschen übertragen werden sollen, an ausgewachsenen Tieren durchgeführt werden. Das durchschnittliche Alter der Patienten mit umschriebenen Knorpeldefekten beträgt je nach Quelle 35 (Årøen et al. 2004) bis 43 Jahre (Curl et al. 1997). Aus diesem Grund wurden in unserer Studie auch nur ausgewachsene Schafe verwendet (Merino, > 6 Jahre alt, mit einem Körpergewicht zwischen 65 – 75 kg). Laut Schneider-Wald et al. werden in den präklinischen Studien zur Knorpelregeneration durchschnittlich 17,4 Versuchstiere eingesetzt (Schneider-Wald et al. 2013). Mit 33 Tieren ist die vorliegende Untersuchung als eine umfangreiche präklinische Studie einzuordnen.

Als häufigste Lokalisation der fokalen Knorpelläsionen beim Menschen werden in der Literatur die mediale Femurkondyle und die patellare Gelenkfläche angegeben (Spahn et al. 2016; Flanigan et al. 2010; Curl et al. 1997; Årøen et al. 2004; Hjelle et al. 2002). Die Indikation zur Behandlung mit knochenmarkstimulierenden Verfahren wird darüber hinaus bei vollschichtigen Knorpeldefekten bis zu einer Größe von 2 - 3 cm<sup>2</sup> gesehen (Welsch et al. 2016; Steinwachs et al. 2014; Brix und Chiari 2012; Proffen et al. 2012; Schewe et al. 2008; Braun et al. 2007). Um die Übertragbarkeit der präklinischen Studie auf die klinische Situation zu ermöglichen, wurden die Knorpeldefekte in dem

untersuchten Tiermodell erstens ebenfalls in der Hauptbelastungszone im Bereich der medialen Femurkondyle gesetzt. Zweitens wurde mit der individuell angefertigten Stanze ein vollschichtiger Defekt entsprechend eines ICRS-Knorpelschadens Grad IIIC gesetzt. Drittens wurde eine Defektfläche von 28,3 mm<sup>2</sup> gewählt, die auf den Menschen übertragen etwa einer Größe von 63 mm<sup>2</sup> entspricht (Osterhoff et al. 2011). Damit erfüllte das Defektmodell die typische Lokalisation, Defektfläche und Defekttiefe eines Knorpelschadens, der im klinischen Fall mittels Anbohrung oder Mikrofrakturierung behandelt worden wäre. Bei den unbehandelten Leerkontrollen wurde außerdem keine Spontanheilung der Knorpelschäden innerhalb der 12 Monate Standzeit beobachtet. Mit einem Durchmesser von  $d = 6$  mm wurde in unserem Schafsmodell also ein „critical size defect“ gesetzt, der keine Fähigkeit zur Selbstregeneration besaß (Schneider-Wald et al. 2013).

## 6.2 Standardisierte Defektbehandlung

Ziel der Studie war die biomechanische Analyse verschiedener Variablen, die bei der Durchführung der knochenmarkstimulierenden Verfahren vom Operateur beeinflusst werden können. Zunächst wurden die Unterschiede im Regeneratgewebe nach Anbohrung und Mikrofrakturierung analysiert. Hierfür wurden zwei Behandlungsgruppen eingeführt, die sich nur anhand des verwendeten Operationsinstrumentes (Ahle bei M3x4 vs. Bohrer bei B3x4) unterschieden. Die Eindringtiefe von 4 mm und der Abstand der Löcher zueinander waren in diesen beiden Gruppen jeweils identisch und orientieren sich dabei an den ursprünglichen, operativen Vorgaben von Steadman et al., die auch so noch heute in der Klinik Anwendung finden (Steadman et al. 2001). Des Weiteren wurde die Auswirkung der Eindringtiefe in den subchondralen Knochen untersucht. Steadman et al. sprachen in der ursprünglichen technischen Erläuterung der Mikrofrakturierung von 2 – 4 mm Eindringtiefe (Steadman et al. 1997). Neuere Studien schlagen eine größere Eindringtiefe in der subchondralen Knochen vor (Zedde et al. 2016; Chen et al. 2011b). Aus diesem Grund wurde eine weitere Gruppe eingeführt, bei der die Defekte wiederum mittels Mikrofrakturierung mit einer Ahle mit drei Perforationen behandelt wurden (M3x2). In dieser Gruppe wurde allerdings nur eine Eindringtiefe von 2 mm zugelassen. Die Recherche zur präklinischen Studienlage knochenmarkstimulierender Verfahren ergab, dass bisher keine Studie die Löcherdichte innerhalb des Defektbereiches untersucht hatte. Die letzte Behandlungsgruppe (B6x4) wurde also in Anlehnung an Gruppe B3x4 wiederum mittels Anbohrung mit 4 mm Eindringtiefe behandelt, aber mit einer doppelt so hohen Dichte an Löchern im Defektbereich. Bei diesen Proben wurden 6 Löcher im Defektbereich gesetzt, bei der Gruppe B3x4 wurden mit identischem

Operationsinstrument nur 3 Löcher gebohrt. Auf diese Art konnte eine Variable isoliert analysiert werden, deren Bedeutung bisher nur unzureichend untersucht wurde.

Kroell et al. konnten in ihren Untersuchungen zeigen, dass auch erfahrene Operateure eine relevante Variabilität beim Setzen der Mikrofrakturen aufwiesen (Kroell et al. 2014). Um die Vergleichbarkeit der verschiedenen Behandlungsgruppen sicherzustellen und die Veränderungen zwischen den Gruppen jeweils nur auf die eine gewünschte Variable zu beschränken, wurden bei unserer Defektbehandlung speziell angefertigte Operationsinstrumente verwendet (Abbildung 17). So konnten der senkrechte Eindringwinkel, die Eindringtiefe und die Dichte der Löcher exakt vorgegeben werden (vgl. Kapitel 4.1.2). Diese standardisierte Defektbehandlung stellte eine Neuheit und besondere Stärke des Studiendesigns dar.

Postoperativ kam es bei keinem der Versuchstiere zu Komplikationen. Die Operationswunden waren stets reizlos. Da bei den Schafen am jeweils kontralateralen Kniegelenk eine weitere Studie realisiert wurde, belasteten diese von Beginn an beide Hinterbeine gleichmäßig. Eine Entlastung und langsame Aufbelastung der Extremität, wie es die Nachbehandlung beim Menschen vorsieht (Welsch et al. 2016), konnte nicht umgesetzt werden. Dies könnte gegebenenfalls einen negativen Einfluss auf die Knorpelregeneration gehabt haben. Falls der mesenchymale Thrombus noch nicht ausreichend gefestigt war, könnten durch eine Belastung Gewebeteile losgelöst und die Defektfüllung gestört worden sein. Andererseits wäre durch eine einseitige Behandlung der Gelenke eine Entlastung des operierten Beines zu erwarten gewesen. Dies hätte durch den fehlenden mechanischen Reiz die Knorpelregeneration ebenfalls negativ beeinträchtigen können. Die postoperative Nachbehandlung dieser Studie entsprach der gängigen Vorgehensweise bei präklinischen Studien am Großtier. Mit einer Standzeit von 12 Monaten gehörte diese Untersuchung zeitlich gesehen zu den längeren Studien im Tiermodell (Zedde et al. 2016; Chen et al. 2011b; Orth et al. 2016b; Marchand et al. 2012; Frisbie et al. 2006b; Eldracher et al. 2014). Nach einer Standzeit von 12 Monaten sollte die Knorpelregeneration soweit fortgeschritten sein, dass biomechanische oder histologische Analysen Unterschiede im Gewebe feststellen können (Frisbie et al. 2003). (Schneider-Wald et al. 2013)

### 6.3 Makroskopische Beurteilung und quantitative Defektfüllung

Die makroskopische Beurteilung der Knorpelregenerate bei Probenentnahme ergab insgesamt sehr uneinheitliche Ergebnisse. Ausgehend vom Rand der Läsionen konnte bei allen Proben eine konzentrische Defektfüllung beobachtet werden (Abbildung 29). Ob es sich hierbei um neugebildeten Regeneratknorpel oder bestehenden hyalinen Knorpel handelte, der aus dem umliegenden Knorpelbereich aufgrund der fehlenden Abstützung

in die Läsion hineingedrückt wurde, ließ sich makroskopisch nicht beurteilen. Das Gewebe legte sich dabei meist zungenförmig ohne feste Verbindung zum subchondralen Knochen in den Defektbereich.

Bei den Leerkontrollen zeigte sich außer der geringen Deckung mit umliegendem Gewebe keine Füllung der Defekte (Abbildung 30). Es konnte folglich bestätigt werden, dass es sich bei der Größe des Knorpelschadens mit Durchmesser  $d = 6 \text{ mm}$  um eine kritische Defektgröße handelte, die keine Selbstregeneration zuließ (Schneider-Wald et al. 2013).

Die Bestimmung der quantitativen Defektfüllung erfolgte mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ, das aufgrund seiner guten Zugänglichkeit und Modularität weite Verbreitung in der biomedizinischen Analyse von Bildern gefunden hat (Schindelin et al. 2015). Während die Defektfüllung in älteren Studien häufig subjektiv vom Untersucher in verschiedene Grade eingeteilt wurde (Frisbie et al. 2006b; Breinan et al. 2000), nutzen Beck et al. in einer neueren Arbeit ebenfalls die objektive Bildanalyse mittels ImageJ (Beck et al. 2016). Mit Hilfe einer Schwellwertanalyse wurden in dieser Studie der ungefüllte Defektgrund und das Regeneratgewebe unterschieden. Grundlage der Bildanalyse war dabei die zweidimensionale Trennung von Farbtönen ohne Tiefenwahrnehmung im Bild. Zum Beispiel bei Spiegelungen auf feuchten Versuchsproben stieß dieses Verfahren deshalb an seine Grenzen. In solchen Fällen mussten vom jeweiligen Untersucher geringe Korrekturen der Flächenauswahl vorgenommen werden. Um trotzdem eine möglichst objektive Messung der Defektfüllung zu gewährleisten, wurde die Analyse der Bilder jeweils von drei unterschiedlichen Untersuchern durchgeführt und es standen pro Defekt durchschnittlich 2,33 Bilder für die Auswertung zur Verfügung. Hierfür wurde eine Messanleitung erstellt, die auf zukünftige, vergleichbare Untersuchungen übertragbar ist.

Bei Betrachtung der prozentualen Defektfüllung aus den fünf Behandlungsgruppen ließ sich ein relevanter Unterschied zwischen den behandelten Gruppen und der Gruppe der Leerkontrollen feststellen. Entsprechend dem ersten, makroskopischen Eindruck waren die Leerkontrollen signifikant geringer mit Gewebe gefüllt als alle anderen Behandlungsgruppen. Dies bestätigt grundsätzlich die Notwendigkeit einer Defektbehandlung. Die gemessene Defektfüllung der Leerkontrollen von  $45,8\% \pm 8,2\%$  (MW  $\pm$  SA) erscheint bei makroskopischer Betrachtung der Knorpelproben sehr hoch. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Untersucher die Defektfläche im Rahmen der Messungen vermutlich größer als den ursprünglichen Defektbereich gewählt haben. Folglich ging die Fläche des Gewebes, das von außen in den Knorpelschaden einwachsen war, wahrscheinlich zu groß in die Messungen ein. Da sich dieser vermeintliche Messfehler



aber in allen Proben wiederfindet, führt dies zu keiner relevanten Verzerrung der Messergebnisse. Würde der Defektbereich kleiner gewählt werden, ergäbe sich eine größere Trennschärfe zwischen den verschiedenen Gruppen. Die Tendenzen und signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen blieben auf jeden Fall bestehen. Eine Lösung dieses Problems wäre eine Skalierung der Bilder gewesen. Die Auflage eines Maßstabs war unter den sterilen Entnahmebedingungen in diesem Fall allerdings nicht möglich. Zukünftig sollte hier über die Verwendung eines sterilen Lineals nachgedacht werden, um die Aufnahmen einheitlich skalieren zu können.

Unter den behandelten Gruppen erzielte die 6-fach angebohrte Gruppe (B6x4) mit  $84,2\% \pm 6,6\%$  Defektfüllung (MW  $\pm$  SA) ein vielversprechendes Ergebnis. Die Messwerte waren signifikant höher als bei beiden mikrofrakturierten Gruppen (M3x4, M3x2). Auch die zweite Gruppe der Bohrungen mit einer Anzahl von 3 Bohrlöchern (B3x4) war signifikant mehr gefüllt als die Gruppe M3x2. Zwischen den Gruppen, die sich in nur einer Variablen unterschieden, konnten lediglich Tendenzen festgestellt werden: Eine höhere prozentuale Defektfüllung wurde jeweils gemessen bei einem tieferen Eindringen in den subchondralen Knochen (M3x2 vs. M3x4), der Bohrung anstelle der Mikrofrakturierung (M3x4 vs. B3x4) und einer höheren Anzahl an Löchern im Defektbereich (B3x4 vs. B6x4). Erst die Kombination aller drei Variablen machte den Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen aus, sodass die Gruppe der Bohrungen mit maximaler Anzahl an Bohrlöchern und maximaler Eindringtiefe in den Knochen die höchsten Werte erreichte.

Beck et al. haben in ihrer präklinischen Studie am Schaf die Knorpelregeneration 26 Wochen nach Mikrofrakturierung, autologer matrixinduzierter Chondrogenese (AMIC) und konservativer Therapie untersucht (Beck et al. 2016). Dieser Publikation lassen sich leider Eindringtiefe und Durchmesser des verwendeten Operationsinstrumentes nicht entnehmen. Unter der Voraussetzung, dass der verwendete „Chondro-Pick“ einen Durchmesser von 1,5 mm besaß, errechnet sich aus der Defektgröße und der Anzahl der Perforationen eine fast identische Löcherdichte innerhalb des Defektbereichs wie in den Gruppen dieser Studie mit 3 Löchern (Löcherdichte von 17% bei Beck et al. und 18% in den Gruppen M3x2, M3x4 und B3x4). Die Bestimmung der Defektfüllung mittels ImageJ ergab bei Beck et al.  $33\% \pm 12\%$  bei den Leerkontrollen,  $63\% \pm 25\%$  nach Mikrofrakturierung und  $68\% \pm 7\%$  nach AMIC (MW  $\pm$  SA). Die Messwerte der Mikrofrakturierung und der Leerkontrollen fielen folglich geringer aus als bei unseren Gruppen, wurden allerdings bereits nach 26 Wochen Standzeit ermittelt. Unter Berücksichtigung des zeitlichen Unterschiedes ergeben sich also durchaus konsistente Ergebnisse. Dies bestätigt wiederum die in dieser Arbeit etablierte Methode zur Bestimmung der quantitativen Defektfüllung.

Letztlich muss bei der Interpretation der hier aufgeführten Daten berücksichtigt werden, dass die gemessene Defektfüllung die Gewebedicke der Regenerate außer Acht lässt. Es handelt sich um eine zweidimensionale Flächendeckung und nicht um das Volumen des regenerativen Gewebes. Außerdem gilt es zu hinterfragen, ob eine höhere Defektfüllung mit einer besseren Defektbehandlung gleichzusetzen ist. Schließlich erlaubt die Defektfüllung keinen Rückschluss auf die Qualität und biomechanische Kompetenz des Regeneratgewebes. Eine möglichst vollständige Defektfüllung ist aus mechanischer Sicht aber entscheidend, um die Lasten im Gelenk auf eine größere Fläche zu verteilen und damit den umliegenden und artikulierenden Gelenkknorpel zu schonen.

## 6.4 Lokale Knorpeldicke

Zu Beginn der biomechanischen Untersuchung erfolgte jeweils die Bestimmung der Dicke der Knorpelregenerate und des nativen Knorpels, um die anschließende Probenindentation in standardisierten, dehnungsabhängigen Stufen durchführen zu können. Zur Knorpeldickenmessung wurden in der Literatur bereits neben einer rein optischen Bestimmung die Nadelindentation und Ultraschall-basierte Verfahren beschrieben (Jurvelin et al. 1995). Bei der optischen Bestimmung wird die Dicke an einem Querschnitt durch das zu untersuchende Gewebe mit Hilfe einer Schieblehre bestimmt (Jurvelin et al. 1987). Die Nadelindentation ist ein invasives Messverfahren, bei dem mit einer Nadel in die Gewebeprobe gestochen wird und der Durchstich durch die Knorpeloberfläche sowie das Erreichen der subchondralen Platte am Kraftauschlag registriert werden (Hoch et al. 1983). Weil bei beiden beschriebenen Verfahren die Probe lokal beschädigt wird, kamen sie für diese Studie nicht in Frage. Die Ultraschall-basierte Technik beruht auf der Reflektion einer mechanischen Welle an der Tidemark bzw. der Schicht des kalzifizierten Knorpels (Modest et al. 1989; Rushfeldt et al. 1981; Töyräs et al. 2003). Da bei faserknorpelartigen Regeneraten nicht von einer charakteristischen Schichtung des Gewebes mit Ausbildung einer Tidemark auszugehen ist, war diese Methode ebenso ungeeignet zur Untersuchung der Proben. Es wurde folglich eine neue Methode zur Knorpeldickenmessung etabliert, die mechanische Knorpeldickenmessung (Abbildung 24). Mit einem zylindrischen Indenter mit Durchmesser  $d = 0,8$  mm wurde die Höhe des Regeneratgewebe sowie des daneben freiliegenden Knochens bestimmt. Die Kraft, mit der die Position auf dem Knochen angefahren wurde (5 N), wurde gewählt, um möglicherweise vorhandenes Gewebe an dieser Stelle zu komprimieren und die Knochenoberfläche zu messen. Im Gegensatz dazu wurde für die Bestimmung der Höhe des Knorpelregenerate ein sehr geringer Kraft-Trigger (5 mN) verwendet, der schon den Kontakt mit weichstem Gewebe registrierte. Ermöglicht wurde dieses neue

Messverfahren durch die hohe Kraftauflösung der verwendeten Prüfmaschine (Föhr et al. 2012).

Die Dicke des Gelenkknorpels im menschlichen Kniegelenk wird mit durchschnittlich 2,2 – 2,5 mm angegeben. Sie unterscheidet sich innerhalb des Kniegelenks und ist am größten im Bereich des Tibiaplateaus (Schneider-Wald et al. 2013; Frisbie et al. 2006a; Franz et al. 2001; Mow et al. 1992). Der hyaline Knorpel von Schafen ist deutlich dünner und wird in der Literatur mit einer durchschnittlichen Dicke von 0,4 – 0,7 mm angegeben (Schneider-Wald et al. 2013; Frisbie et al. 2006a). Die gemessene Knorpeldicke unserer nativen Knorpelproben lag mit  $0,669 \pm 0,249$  mm (MW  $\pm$  SA) also in dem zu erwartenden Bereich für Schafsknorpel. Während bei den drei Behandlungsgruppen mit 4 mm Eindringtiefe keine signifikant abweichende Knorpeldicke gemessen wurde, fiel die durchschnittliche Dicke des regenerativen Gewebes in der Gruppe mit nur 2 mm Eindringtiefe (M3x2) mit  $d = 0,429 \pm 0,210$  mm (MW  $\pm$  SA) signifikant geringer aus als beim nativen Knorpel.

Die gemessene lokale Knorpeldicke stellt einen punktuellen Wert auf einer der Regeneratinseln dar. Sie darf nicht als flächendeckende Dicke des Regeneratgewebes interpretiert werden. Ziel der Messungen war nicht der Vergleich mit den Knorpeldicken anderer präklinischer Studien. In ersten Linie sollten die individuellen, dickenabhängigen Dehnungsstufen der Probenindentation berechnet werden können. Die beschriebene Dickenmessung eignete sich hierfür sehr gut. Aus der Dickenmessung ergeben sich dennoch zwei weitere bemerkenswerte Schlussfolgerungen: Erstens erreichte nur eine Gruppe, nämlich die Gruppe mit der geringsten Eindringtiefe in den subchondralen Knochen, signifikant geringere Knorpeldicken im Vergleich zum nativen Knorpel. Eine geringere Eindringtiefe bei der Mikrofrakturierung hat sich also negativ auf die Ausbildung einer physiologischen Gewebedicke ausgewirkt. Zweitens unterscheiden sich die anderen Behandlungsgruppen wie beschrieben nicht signifikant von dem nativen Knorpel. Es ist durch eine optimierte Behandlung also möglich, Regenerate zu generieren, die bezogen auf die Knorpeldicke dem ursprünglichen nativen Knorpel in nichts nachstehen.

## 6.5 Elastizitätsmoduln und viskoelastisches Verhalten

Es existieren verschiedene, etablierte Methoden zur Prüfung der biomechanischen Eigenschaften von Knorpelproben *in-vitro*. Die in dieser Arbeit angewandte Indentation zeichnet sich dabei im Vergleich zur Confined oder Unconfined Compression durch die größte Ähnlichkeit zur Belastung *in-vivo* aus (Mansour 2003). Während die Confined und Unconfined Compression an ausgestanzten Probenzylindern durchgeführt werden, erlaubt die Indentation die Verwendung großer osteochondraler Proben, bei denen Knorpel und Knochen in ihrem physiologischen Verbund untersucht werden können. Da

hierbei im Gegensatz zu anderen Testverfahren keine zusätzlichen künstlichen Effekte am Probenrand entstehen, wird die Indentation auch als *in-situ*-Verfahren bezeichnet (Hurschler und Abedian 2013; Lu und Mow 2008; Mansour 2003).

Die hier angewandte Knorpelindentation wurde in Anlehnung an den von Töyräs et al. beschriebenen Stufenversuch durchgeführt (Töyräs et al. 1999). In drei unterschiedlichen Behandlungsgruppen führten die Autoren in ihrer Studie eine enzymatische Degradierung von Rinderknorpel durch. In der ersten Gruppe wurde das aus Kollagenfasern bestehende Grundgerüst des Knorpels durch Beigabe einer Kollagenase zerstört. Die nächste Gruppe wurde mit einer Chondroitinase behandelt, sodass etwa die Hälfte der im Gewebe befindlichen Proteoglykane zersetzt wurden. Die letzte Gruppe wurde als Kontrollgruppe ohne Zusatz von Enzymen unter identischen Rahmenbedingungen für die gleiche Zeit inkubiert. Töyräs et al. führten anschließend eine Gewebecharakterisierung mittels hochfrequentem Ultraschall, mechanischer Indentation und mikroskopischer Untersuchung durch. Die enzymatisch degradierten Knorpelproben zeigten neben Veränderungen im Ultraschall beide signifikant geringere Elastizitätsmoduln als die Kontrollgruppe. Sowohl der Verlust von Kollagen als auch von Proteoglykanen führte also zur Erweichung des Gewebes. Des Weiteren wurde bei der mit Chondroitinase behandelten Gruppe eine Änderung im viskoelastischen Verhaltens beschrieben. Die Autoren berechneten dazu ein Verhältnis zwischen den Spitzenkräften zu Beginn einer Indentationsstufe und den Kräften im Equilibrium am Ende einer Indentationsstufe (vgl. Kapitel 4.3.2). Dieses Kräfteverhältnis vergrößerte sich signifikant beim Knorpel mit verringertem Gehalt an Proteoglykanen. Das Versuchsprotokoll von Töyräs et al. hatte sich folglich zur Untersuchung von Knorpelgewebe mit veränderter Zusammensetzung und teilweise minderwertigen biomechanischen Eigenschaften bewährt. Da wir bei dem regenerativen Ersatzgewebe in unserer präklinischen Studie ähnliche strukturelle und biomechanische Unterschiede erwarteten, wählten wir den Stufenversuch zur Prüfung unserer Knorpelproben. (Töyräs et al. 1999)

Der Stress-Relaxations-Versuch wurde positionsgeregelt mit einem soliden, zylindrischer Indentor (Durchmesser  $d = 0,8$  mm) durchgeführt (Föhr et al. 2012). Bei einer positionsgeregelten Indentation verändert der Stempel seine Position um einen festgelegten Weg und bewirkt dabei eine gewünschte Dehnung der Probe. Gleichzeitig misst das Prüfsystem die Kräfte, die für die Realisierung und das Halten dieser Dehnungsstufe aufgebracht werden müssen. Unsere Versuchsproben wiesen unterschiedlichste Knorpeldicken auf und trotzdem sollten einheitliche Dehnungsstufen vorgegeben werden. Deshalb wurde für jeden Indentationsversuch ein individueller Weg-Zeit-Verlauf berechnet und über die interaktive Benutzeroberfläche des Prüfsystems eingegeben. Die stufenweise Indentation erfolgte in 15 Schritten bis zu einer maximalen Dehnung von 40%

(zunächst 10 Schritte à 2% Dehnung, im Anschluss 5 Schritte à 4% Dehnung). Die Kompressionsschritte wurden mit einer Geschwindigkeit von 1,0 mm/min realisiert. Nach jeweils 100 s Relaxation wurde der nächste Schritt begonnen. Für eine 2%ige Dehnung betrug der Weg des Indentors zwischen 8,6 µm bei der Gruppe M3x2 und 12,7 µm bei der Gruppe Nativ (Angaben entsprechen dem Median). Um den Indentationsversuch auf der Knorpeloberfläche zu starten, wurde diese mit einem minimalen Kraft-Trigger von 5 mN wie bei der Knorpeldickenmessung angefahren. Diese geringen Kraft- und individuellen Positionsveränderungen konnten aufgrund der feinen Ausregulierung und hohen Sensitivität des verwendeten Prüfsystems realisiert werden (Föhr et al. 2012). Zu Beginn einer Indentationsstufe kommt es aufgrund der plötzlichen Dehnungssteigerung zu einer viskösen Strömung innerhalb der fluiden Phase. Sie wird aus der festen Phase herausgedrückt oder verdrängt sich innerhalb dieser durch Poren im Gewebe (Mow et al. 1984). Dabei entsteht ein Reibungswiderstand, der dem Gewebe eine hohe Spannung verleiht. Diese kann als Spitzenkraft  $F_{peak}$  zu Beginn jeder Indentationsstufe gemessen werden (Töyräs et al. 1999). Wird die Dehnung auf dieser Stufe beibehalten, lässt die Spannung nach und erreicht einen Tiefpunkt (Lu und Mow 2008). Sie wird im Indentationsversuch als Kraft im Gleichgewicht bzw. Equilibrium  $F_{equil}$  gemessen. Während die Spannung zu Beginn der Kompression also auf dem Strömungswiderstand der fluiden Phase und damit auf der Permeabilität des Gewebes beruht, ist die Spannung im Equilibrium von der Steifigkeit der soliden Matrix abhängig (Mow et al. 1984; Makela und Korhonen 2016; Korhonen et al. 2002; Li et al. 1999).

Aus den jeweils am Ende der Relaxationsphase gemessenen Kräften im Equilibrium  $F_{equil}$  wurde für jede Indentationsstufe die Spannung  $\sigma$  berechnet. Diese wurde anschließend im Spannungs-Dehnungs-Diagramm aufgetragen. Zur Berechnung des Elastizitätsmoduls  $E_{measured}$  wurde die Steigung im linearen Bereich des Spannungs-Dehnungs-Diagramms ermittelt. Hierfür erfolgte die automatisierte Berechnung einer Regressionsgerade durch Microsoft Excel. Die Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden erreichten Werte zwischen  $96,1\% \pm 2,8\%$  bei der Gruppe B3x4 und  $98,7\% \pm 1,1\%$  beim nativen Knorpel (MW  $\pm$  SA). Dies bestätigt die vorausgesetzte lineare Steigung im ausgewählten Bereich der Spannungs-Dehnungs-Kurve. Der endgültige Elastizitätsmodul  $E$  wurde mit der von Töyräs et al. beschriebenen Formel berechnet (Töyräs et al. 1999). Neben dem gemessenen E-Modul  $E_{measured}$  gingen der Radius des Indentors  $a = 0,4$  mm, die individuelle Knorpeldicke  $h$ , die Poisson's ratio  $\nu = 0,1$  (nach Jurvelin et al. 1997), sowie der Skalierungsfaktor  $\kappa$  in die Berechnung ein. Der Skalierungsfaktor  $\kappa$  musste für jede Messung individuell berechnet werden. Zhang et al. haben zu diesem Zweck eine Wertetabelle erarbeitet und vorgeschlagen die fehlenden Werte mittels linearer

Interpolation zu berechnen (Zhang et al. 1997). Durch den eingeschränkten Wertebereich  $W(\kappa) = [1,209; 3,999]$  mussten insgesamt zwei Messungen verworfen werden, da sich für sie kein  $\kappa$  berechnen ließ. Betroffen waren Messungen von Proben mit sehr geringer Knorpeldicke der Gruppe M3x2 und der Gruppe B6x4, sodass sich in diesen Gruppen der Stichprobenumfang für die Berechnung des Elastizitätsmoduls  $E$  jeweils auf  $n = 11$  reduzierte. Durch die Identifikation und Eliminierung von zwei Ausreißern in der Gruppe M3x2 und einem Ausreißer in der Gruppe M3x4 verringerte sich der Stichprobenumfang in diesen Kategorien nochmals geringfügig. Mit einer Größe von  $n = 9$  enthielt die Behandlungsgruppe M3x2 die geringste, aber dennoch hinreichende Anzahl an Werten für den E-Modul.

Der ermittelte Elastizitätsmodul der Knorpelregenerate, die mit Anbohrung behandelt wurden (B3x4, B6x4), wies in den Untersuchungen nach 12-monatiger Standzeit keinen statistisch signifikanten Unterschied zu dem E-Modul des nativen Knorpels auf. Die beiden mit Anbohrung therapierten Gruppen unterschieden sich hinsichtlich des Elastizitätsmoduls ebenfalls nicht statistisch signifikant voneinander. Die Anzahl der Perforationen im Defektbereich hatte also keine entscheidende Auswirkung auf die mechanische Kompetenz des Gewebes. Im Gegensatz dazu wurde bei beiden mikrofrakturierten Gruppen (M3x2, M3x4) ein geringerer Elastizitätsmodul gemessen als beim nativen Knorpel und bei den Regeneraten nach Anbohrung. Aus der Mikrofrakturierung resultierte ein weiches Regeneratgewebe als aus der Anbohrung mit identischer Eindringtiefe und Löcherdichte (M3x4 vs. B3x4). Keinen statistisch signifikanten Unterschied bewirkte dagegen die geringere Eindringtiefe von 2 mm in der Gruppe M3x2 gegenüber der Eindringtiefe von 4 mm in der Gruppe M3x4. Zusammenfassend bildete sich nach der Mikrofrakturierung ein Gewebe mit geringerem E-Modul aus als im gesunden und im mit Anbohrung behandelten Knorpelgewebe. Die Knorpelregeneration nach Anbohrung brachte dagegen ein Gewebe mit ähnlicher biomechanischer Kompetenz hervor wie es der physiologische, native Knorpel besaß. Die absoluten Werte des E-Moduls aus der Arbeit von Töyräs et al. können nicht mit unseren ermittelten Werten verglichen werden, da die finnischen Forscher Rinderknorpel und zudem einen anderen Indentor verwendet hatten. Trotzdem erinnert der geringe Elastizitätsmodul der mikrofrakturierten Gruppen in unserer Arbeit an den enzymatisch degradierten, minderwertigen Knorpel, den Töyräs et al. untersucht hatten (Töyräs et al. 1999). Im Rahmen weiterer histologischer und biochemischer Analysen sollten mögliche Parallelen in der Knorpelstruktur zwischen unseren Regeneraten und dem enzymatisch degradierten Knorpel untersucht werden. Darüber hinaus zeigten die Messungen, dass mit dem in dieser Arbeit verwendeten Prüfsystem vergleichbare, mechanische Untersuchungen

von enzymatisch degradiertem Schafsknorpel realisierbar wären. Diese könnten wiederum Rückschlüsse auf die Funktion des Regeneratknorpels erlauben. Der Grund für die unterschiedlichen biomechanischen Eigenschaften der Regenerate liegt nach Auffassung des Autors in der andersartigen Eröffnung des subchondralen Knochens. Aus diesem Grund wurde wahrscheinlich auch zwischen den zwei mit Anbohrung behandelten Gruppen kein Unterschied hinsichtlich des Elastizitätsmoduls festgestellt. Die höhere Löcherdichte der Gruppe B6x4 erbrachte die höchste quantitative Defektfüllung, hatte aber keine Auswirkung auf die mechanischen Eigenschaften. Die Perforation des Knochens mit der Ahle anstelle des Bohrers hatte dagegen einen Einfluss auf die mechanische Kompetenz des Gewebes. Wie in einer von Chen et al. durchgeführten präklinischen Studien gezeigt wurde, entfernte die Anbohrung effektiv alle Knochenrümpfer, es entstanden saubere Ränder in den Bohrkanälen und die feinen Tunnel in die Trabekel des subchondralen Knochens hinein blieben eröffnet (Abbildung 39). Im Gegensatz dazu bewirkte das Stößeln mit einer Ahle eine Frakturierung und Verdichtung der angrenzenden Knochenstrukturen. Die Hohlräume zwischen den Knochenbälkchen wurden versiegelt, was das Austreten des Blutes mit den mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark erschwerte. Darüber hinaus wurden bei der Mikrofrakturierung signifikant mehr leere Osteozytenlakunen gefunden als bei der Anbohrung, was von den Autoren auf eine direkte mechanische Schädigung der Osteozyten und die Abscherung des Gewebes zurückgeführt wurde (Chen et al. 2009). Während des Bohrvorgangs wurde auf eine sorgfältige Spülung geachtet. Hierdurch kann eine schädigende Hitzeentwicklung beim Bohren in Knochen effektiv verhindert werden (Augustin et al. 2008). Eine solche computertomographische Untersuchung der osteochondralen Probenstücke aus unserer Studie kann weitere wichtige Aspekte der Knorpelregeneration identifizieren.

Zur Charakterisierung der viskoelastischen Eigenschaften wurde im stufenweisen Indentationsversuch für jede Untersuchungsgruppe neben dem E-Modul zusätzlich das Verhältnis der Spitzenkräfte  $F_{peak}$  zu den Kräften im Equilibrium  $F_{equil}$  berechnet. Die Bestimmung erfolgte für die Indentationsstufen 7, 8 und 9 entsprechend 14%, 16% und 18% Dehnung (vgl. Kapitel 4.3.2). Konnte in einzelnen Fällen die vorgegebene Dehnung nicht unmittelbar zu Beginn der Indentationsstufe realisiert werden, wurde dieser Schritt aus der Messung ausgeschlossen, um Verfälschungen der Spitzenkräfte zu vermeiden.

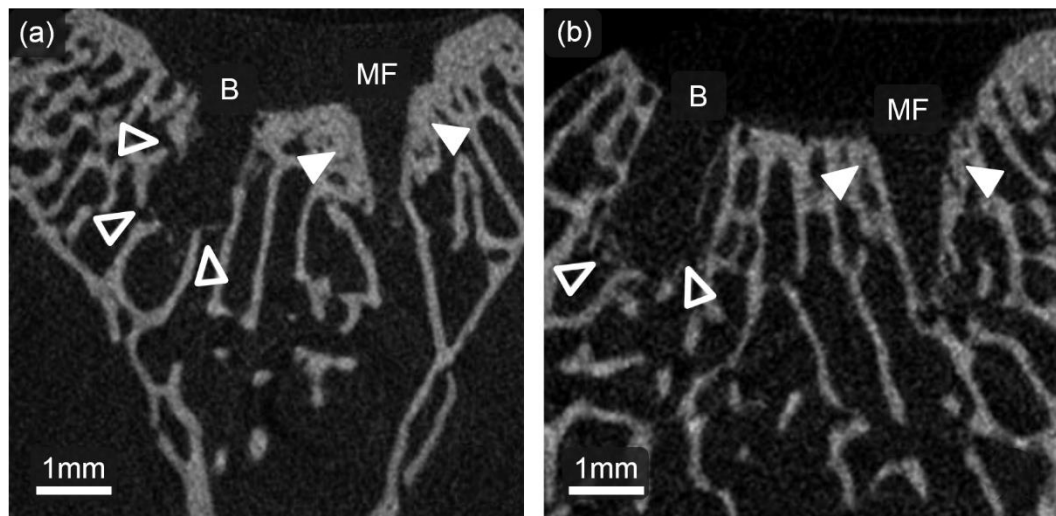


Abbildung 39: Bilder von Kaninchen-Trochlea aus dem micro-CT mit vertikaler Schnittführung durch die Perforationslöcher einen Tag nach Anbohrung (B) und Mikrofrakturierung (MF). Die gefüllten Pfeilspitzen zeigen den verdichteten, frakturierten Knochen um die mikrofrakturierten Löcher. Die leeren Pfeilspitzen markieren Öffnungen in den subchondralen Raum nach Anbohrung. Als Eindringtiefe wurden 2 mm gewählt. (modifiziert nach Chen et al. 2009)

Die Kräfteverhältnisse von nativem Knorpel, M3x2 und M3x4 unterschieden sich nicht signifikant voneinander. In diesem Fall wichen die Gruppen der angebohrten Knorpelproben von den restlichen Gruppen aber ab. Die Dehnung des mittels Anbohrung behandelten Regeneratgewebes aus Gruppe B3x4 bewirkte verhältnismäßig höhere Spitzenkräfte als die Dehnung der mikrofrakturierten und ansonsten identischen Behandlungsgruppe M3x4. Bei Töyräs et al. wiesen die Proben mit geringerem Gehalt an Proteoglykanen ein höheres Kräfteverhältnis, aber einen geringeren E-Modul als die Vergleichsgruppen auf (Töyräs et al. 1999). In unseren Untersuchungen besaßen die beiden Gruppen mit den hohen Spitzenkräften (B3x4, B6x4) allerdings keinen niedrigeren Elastizitätsmodul als der physiologische, native Knorpel. Sie wiesen trotz größerem Kräfteverhältnis sogar einen höheren E-Modul im Equilibrium auf als die mikrofrakturierten Gruppen. Insgesamt lässt sich das höhere Kräfteverhältnis der mit Anbohrung behandelten Proben nur schwer interpretieren. Das Gewebe besaß am Ende der Relaxationsphase, als die fluide Phase nicht mehr in Bewegung war, eine höhere Spannung als die mikrofrakturierten Proben. Gleichzeitig traten allerdings initial höhere Spitzenkräfte auf, was durch eine veränderte Permeabilität innerhalb des Regeneratgewebes hervorgerufen werden kann (Mow et al. 1984). Eine Verminderung der Permeabilität würde eine Erhöhung des Strömungswiderstandes im Gewebe und damit der Kräfte, die zu Beginn der Dehnungssteigerung auftreten, bewirken. Um herauszufinden ob oder inwieweit die unterschiedlichen viskoelastischen Eigenschaften mit dem strukturellen



Aufbau der Knorpelregenerate korrelieren, bedarf es neben der biomechanischen Prüfung zusätzlicher Analysen von Histologie und Biochemie der Regenerate.

## 6.6 Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit wurde ein präklinisches Tiermodell realisiert, das hinsichtlich Defektgröße und -lokalisierung auf die bestehende klinische Situation ausgerichtet war. Durch die standardisierte Defektbehandlung der umschriebenen vollschichtigen Knorpelschäden konnten Variablen der knochenmarkstimulierenden Verfahren analysiert werden, die in der Literatur bislang nur wenig Beachtung gefunden hatten. Um die Defektfüllung in den hier betrachteten 12-Monatsgruppen zu quantifizieren, wurde eine halbautomatisierte Schwellwert-basierte Bildanalyse vorgenommen. Es wurde eine mechanische Knorpeldickenmessung durchgeführt, die sich für die zerstörungsfreie Untersuchung von Knorpelregeneraten bewährte. Mit Hilfe der stufenweisen Indentation konnten die wichtige mechanische Kompetenz der Knorpelregenerate bestimmt und viskoelastische Eigenschaften identifiziert werden. Der Studienaufbau und die Auswertungsmethoden haben es ermöglicht, das regenerative Ersatzgewebe mit Hilfe mechanischer Analysen quantitativ zu beschreiben. Während die Erhöhung der Löcherdichte im Defektbereich die größte prozentuale Defektfüllung bewirkte, wurde durch die Verminderung der Eindringtiefe in den Knochen die Knorpeldicke negativ beeinflusst. Nach der Anbohrung des subchondralen Knochens wurde im Vergleich zur Mikrofrakturierung ein höherer E-Modul gemessen, der dem nativen E-Modul sehr ähnlich war. Zusammenfassend ergibt sich aus unseren präklinischen biomechanischen Untersuchungen also die Empfehlung, die Knochenmarkstimulierung mittels Anbohrung, maximaler Dichte an Löchern im Defektbereich und mit einer Eindringtiefe von mindestens 4 mm durchzuführen. Der Vergleich mit histologischen, biochemischen und radiologischen Auswertungen stellt die nächsten Arbeitsschritte dar, um den interdisziplinären Charakter der Thematik zu festigen.

## 7 Zusammenfassung

### *Hintergrund:*

Mikrofrakturierung und Anbohrung des subchondralen Knochens sind etablierte Methoden zur regenerativen Behandlung lokaler Defekte im Gelenkknorpel. Zur Analyse wichtiger Variablen in der operativen Ausführung dieser Methoden wurden bislang nur wenige standardisierte, präklinische Studien durchgeführt. Darüber hinaus werden vornehmlich histologische und biochemische Untersuchungen angestellt, im Gegensatz zur deutlich selteneren Evaluierung von biomechanischen Parametern. Für die Funktionsweise von Gelenkknorpel ist die Quantifizierung dieser mechanischen, viskoelastischen Eigenschaften jedoch unabdingbar, da das Regeneratgewebe in der Lage sein muss, die ursprünglichen, physiologischen Lasten später wieder zu übernehmen.

### *Material und Methodik:*

Untersucht wurden Proben von 33 adulten Schafen mit umschriebenen Knorpeldefekten, die 12 Monate nach standardisierter, operativer Behandlung durch knochenmarkstimulierende Verfahren entnommen wurden. Die fünf Behandlungsgruppen unterschieden sich hinsichtlich der Methode zur Eröffnung des subchondralen Knochens (Mikrofrakturierung vs. Anbohrung vs. unbehandelte Leerkontrollen), der Eindringtiefe in den Knochen (2 mm vs. 4 mm) und der Löcherdichte (3 Löcher vs. 6 Löcher im Defektbereich). Um die quantitative Defektfüllung zu ermitteln, wurde eine halbautomatisierte, Schwellwert-basierte Bildanalyse durchgeführt. Zur Bestimmung der lokalen Gewebedicke der Regenerate wurde eine mechanische Dickenmessung angewandt. Die biomechanische Untersuchung des beobachteten Regeneratknorpels erfolgte in Form einer stufenweisen dehnungsabhängigen Indentation mit je einer Relaxationsphase von 100 s unter Verwendung eines zylindrischen Prüfstempels ( $d = 0,8$  mm). Neben dem im Defekt entstandenen Regeneratknorpel wurden native Knorpelareale mechanisch geprüft. Alle Proben befanden sich zehn Minuten vor, wie auch während der Messung in einer Pufferlösung (PBS) bei Raumtemperatur. Für die Bestimmung des Elastizitätsmoduls unter Verwendung des Stufenversuchs wurde auf bekannte Berechnungsformeln aus der Literatur zurückgegriffen (Töyräs et al. 1999).

### *Ergebnisse:*

Die unbehandelten Leerkontrollen zeigten nach einer Standzeit von 12 Monaten keine Selbstregeneration. Bei der höchsten Dichte an Löchern im Defektbereich (B6x4) konnte mit  $84,2\% \pm 6,6\%$  (MW  $\pm$  SA) die höchste prozentuale Defektfüllung ermittelt werden. Die beiden mikrofrakturierten Gruppen erreichten im Vergleich dazu statistisch

signifikant geringere Werte (M3x2:  $64,8\% \pm 13,5\%$  mit  $p \leq 0,001$ ; M3x4:  $70,7\% \pm 11,4\%$  mit  $p \leq 0,05$ ). Die gemessene Knorpeldicke unterschied sich nur in der Gruppe M3x2 mit der geringeren Eindringtiefe statistisch signifikant von der nativen Knorpeldicke ( $0,429 \pm 0,210$  mm vs.  $0,669 \pm 0,249$  mm;  $p \leq 0,05$ ). Alle anderen Behandlungsmethoden erreichten Knorpeldicken, die sich nicht signifikant vom nativen Knorpel unterschieden. Der berechnete Elastizitätsmodul betrug beim nativen Knorpel  $0,63 \pm 0,34$  MPa, nach Behandlung durch Anbohrung mit 3 Löchern (B3x4)  $0,71 \pm 0,39$  MPa und mit 6 Löchern (B6x4)  $0,66 \pm 0,38$  MPa. Nach der Mikrofrakturierung wurden mit  $0,16 \pm 0,17$  MPa (M3x2) und  $0,17 \pm 0,18$  MPa (M3x4) statistisch signifikant geringere Elastizitätsmoduln gemessen als nach der Anbohrung. Aus der stufenweisen Indentation wurde außerdem das Verhältnis der Spitzenkraft zur Kraft im Gleichgewichtszustand ermittelt, um das viskoelastische Materialverhalten vergleichen zu können. Für den nativen Knorpel betrug dieser dimensionslose Quotient  $1,72 \pm 0,25$ , nach Mikrofrakturierung  $1,99 \pm 0,83$  (M3x2) bzw.  $1,75 \pm 0,44$  (M3x4) und nach Anbohrung  $2,99 \pm 1,41$  (B3x4) bzw.  $2,66 \pm 0,86$  (B6x4). Die Kräfteverhältnisse nach Anbohrung waren damit statistisch signifikant höher als beim nativen Knorpel und nach Mikrofrakturierung.

### *Diskussion:*

Aus den Versuchen folgt, dass nach Anbohrung ein ähnlicher Elastizitätsmodul gemessen wird wie bei nativem Knorpel. Bei der Mikrofrakturierung sind die Werte hingegen signifikant geringer. Darüber hinaus kann durch die Anbohrung eine höhere prozentuale Defektfüllung erreicht werden, die zusätzlich durch eine hohe Dichte an Perforationen verbessert wird. Eine geringere Knorpeldicke wurde lediglich bei der Mikrofrakturierung mit 2 mm Eindringtiefe gemessen. Hierdurch wird bestätigt, dass die Eindringtiefe in den subchondralen Raum bei der Knorpelregeneration von hoher Bedeutung ist. Das unterschiedliche viskoelastische Verhalten nach Anbohrung und nach Mikrofrakturierung deutet auf eine andersartige Knorpelstruktur der jeweiligen Regenerate hin. Die geplanten histologischen und biochemischen Analysen der Knorpelregenerate lassen auf neue Erkenntnisse hoffen. Methodisch hat sich die stufenweise Indentation auch bei Regeneratgewebe als hervorragendes Messverfahren erwiesen und wird auch in Zukunft eine große Rolle bei vergleichenden Gewebeuntersuchungen spielen.

## 8 Literatur

Aigner T (2003) Collagens—major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55:1569–1593. doi:10.1016/j.addr.2003.08.009

Albrecht D, Weise K (2008) Therapie von Gelenkknorpelschäden. *Chirurg* 79:989–1000. doi:10.1007/s00104-008-1600-0

Anders J, Schewe B, Weise K, Gaissmaier C, Fritz J, Mollenhauer J, Schneide U, Marlovits S (2003) Verlauf klinisch symptomatischer Knorpelschäden des Kniegelenks. Ergebnisse ohne und mit biologischer Rekonstruktion. *Deutsches Ärzteblatt : Ausgabe A, Praxis-Ausgabe, niedergelassene Ärzte* 100:2448

Archer CW, Francis-West P (2003) The chondrocyte. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35:401–404. doi:10.1016/S1357-2725(02)00301-1

Årøen A, Løken S, Heir S, Alvik E, Ekeland A, Granlund OG, Engebretsen L (2004) Articular Cartilage Lesions in 993 Consecutive Knee Arthroscopies. *Am J Sports Med* 32:211–215. doi:10.1177/0363546503259345

Arokoski JP, Jurvelin JS, Väättäinen U, Helminen HJ (2000) Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 10:186–198

Augustin G, Davila S, Mihoci K, Udiljak T, Vedrina DS, Antabak A (2008) Thermal osteonecrosis and bone drilling parameters revisited. *Archives of orthopaedic and trauma surgery* 128:71–77. doi:10.1007/s00402-007-0427-3

Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spanel-Borowski K, Wennemuth G, Wolff W, Wurzinger LJ, Zilch H-G (2014) *Anatomie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Balke H (2014) *Einführung in die Technische Mechanik; Festigkeitslehre*. Springer, Berlin

Bauer M, Jackson RW (1988) Chondral lesions of the femoral condyles: a system of arthroscopic classification. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 4:97–102

- Beck A, Murphy DJ, Carey-Smith R, Wood DJ, Zheng MH (2016) Treatment of Articular Cartilage Defects With Microfracture and Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis Leads to Extensive Subchondral Bone Cyst Formation in a Sheep Model. *The American journal of sports medicine* 44:2629–2643. doi:10.1177/0363546516652619
- Bedi A, Feeley BT, Williams RJ (2010) Management of articular cartilage defects of the knee. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 92:994–1009. doi:10.2106/JBJS.I.00895
- Behrens P, Bosch U, Bruns J, Erggelet C, Esenwein SA, Gaissmaier C, Krackhardt T, Lohnert J, Marlovits S, Meenen NM, Mollenhauer J, Nehrer S, Niethard FU, Noth U, Perka C, Richter W, Schafer D, Schneider U, Steinwachs M, Weise K (2004) Indikations- und Durchführungsempfehlungen der Arbeitsgemeinschaft "Gewebereneration und Gewebeersatz" zur Autologen Chondrozyten-Transplantation (ACT). *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete* 142:529–539. doi:10.1055/s-2004-832353
- Benninghoff A (1925) Form und Bau der Gelenkknorpel in ihren Beziehungen zur Funktion. *Z.Zellforsch* 2:783–862. doi:10.1007/BF00583443
- Benthien JP, Behrens P (2010) Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis (AMIC): Combining Microfracturing and a Collagen I/III Matrix for Articular Cartilage Resurfacing. *Cartilage* 1:65–68. doi:10.1177/1947603509360044
- Benthien JP, Behrens P (2013) Reviewing subchondral cartilage surgery: considerations for standardised and outcome predictable cartilage remodelling: a technical note. *International orthopaedics* 37:2139–2145. doi:10.1007/s00264-013-2025-z
- Benthien JP, Behrens P (2011) The treatment of chondral and osteochondral defects of the knee with autologous matrix-induced chondrogenesis (AMIC): method description and recent developments. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA* 19:1316–1319. doi:10.1007/s00167-010-1356-1
- Bert JM (1997) Abrasion arthroplasty. *Operative Techniques in Orthopaedics* 7:294–299. doi:10.1016/S1048-6666(97)80032-8
- Blain EJ, Mason DJ, Duance VC (2003) The effect of cyclical compressive loading on gene expression in articular cartilage. *Biorheology* 40:111–117
- Braun S, Vogt S, Imhoff AB (2007) Stadiengerechte operative Knorpeltherapie. Aktueller Stand. *Der Orthopäde* 36:589. doi:10.1007/s00132-007-1095-2
- Breinan HA, Martin SD, Hsu HP, Spector M (2000) Healing of canine articular cartilage defects treated with microfracture, a type-II collagen matrix, or cultured autologous

chondrocytes. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 18:781–789. doi:10.1002/jor.1100180516

Brinckmann P, Frobin W, Leivseth G (2000) *Orthopädische Biomechanik*. Thieme, Stuttgart u.a.

Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *The New England journal of medicine* 331:889–895. doi:10.1056/NEJM199410063311401

Brittberg M, Winalski CS (2003) Evaluation of cartilage injuries and repair. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 85-A Suppl 2:58–69

Brix MO, Chiari C (2012) Knorpelregeneration. *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie* 150:41. doi:10.1055/s-0032-1315242

Brommundt E, Sachs G, Sachau D (2006) *Technische Mechanik; Eine Einführung*. De Gruyter, München

Brucker PU, Braun S, Imhoff AB (2008) Mega-OATS-Technik--autogene Knorpel-Knochen-Transplantation als Salvage-Verfahren bei grossen osteochondralen Defekten am Femurkondylus. *Operative Orthopädie und Traumatologie* 20:188–198. doi:10.1007/s00064-008-1301-3

Bruns J, Steinhagen J (1999) Transplantation chondrogener Gewebe zur Behandlung von Gelenkknorpeldefekten. *Orthopäde* 28:52. doi:10.1007/s001320050321

Buckwalter JA, Mankin HJ (1998) Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instructional course lectures* 47:477–486

Buma P, Pieper JS, van Tienen T, van Susante JL, van der Kraan PM, Veerkamp JH, van den Berg WB, Veth RP, van Kuppevelt TH (2003) Cross-linked type I and type II collagenous matrices for the repair of full-thickness articular cartilage defects—A study in rabbits. *Biomaterials* 24:3255–3263. doi:10.1016/S0142-9612(03)00143-1

Chen H, Sun J, Hoemann CD, Lascau-Coman V, Ouyang W, McKee MD, Shive MS, Buschmann MD (2009) Drilling and microfracture lead to different bone structure and necrosis during bone-marrow stimulation for cartilage repair. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 27:1432–1438. doi:10.1002/jor.20905

Chen H, Chevrier A, Hoemann CD, Sun J, Ouyang W, Buschmann MD (2011a) Characterization of subchondral bone repair for marrow-stimulated chondral defects and its

relationship to articular cartilage resurfacing. *The American journal of sports medicine* 39:1731–1740. doi:10.1177/0363546511403282

Chen H, Hoemann CD, Sun J, Chevrier A, McKee MD, Shive MS, Hurtig M, Buschmann MD (2011b) Depth of subchondral perforation influences the outcome of bone marrow stimulation cartilage repair. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 29:1178–1184. doi:10.1002/jor.21386

Chevrier A, Kouao ASM, Picard G, Hurtig MB, Buschmann MD (2015) Interspecies comparison of subchondral bone properties important for cartilage repair. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 33:63–70. doi:10.1002/jor.22740

Chiang H, Liao CJ, Wang YH, Huang HY, Chen CN, Hsieh CH, Huang YY, Jiang CC (2010) Comparison of articular cartilage repair by autologous chondrocytes with and without in vitro cultivation. *Tissue engineering. Part C, Methods* 16:291–300. doi:10.1089/ten.tec.2009.0298

Ciccittini F, Ding C, Wluka A, Davis S, Ebeling PR, Jones G (2005) Association of cartilage defects with loss of knee cartilage in healthy, middle-age adults: a prospective study. *Arthritis and rheumatism* 52:2033–2039. doi:10.1002/art.21148

Clift SE (1992) Finite-element analysis in cartilage biomechanics. *Journal of Biomedical Engineering* 14:217–221. doi:10.1016/0141-5425(92)90055-P

Cohen NP, Foster RJ, Mow VC (1998) Composition and dynamics of articular cartilage: structure, function, and maintaining healthy state. *The Journal of orthopaedic and sports physical therapy* 28:203–215. doi:10.2519/jospt.1998.28.4.203

Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG (1997) Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 13:456–460

Dijkgraaf LC, Bont LG de, Boering G, Liem RS (1995) Normal cartilage structure, biochemistry, and metabolism. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 53:924–929. doi:10.1016/0278-2391(95)90283-X

Eldracher M, Orth P, Cucchiaroni M, Pape D, Madry H (2014) Small subchondral drill holes improve marrow stimulation of articular cartilage defects. *The American journal of sports medicine* 42:2741–2750. doi:10.1177/0363546514547029

- Fehrenbacher A, Steck E, Rickert M, Roth W, Richter W (2003) Rapid regulation of collagen but not metalloproteinase 1, 3, 13, 14 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1, 2, 3 expression in response to mechanical loading of cartilage explants in vitro. *Archives of biochemistry and biophysics* 410:39–47
- Flanigan DC, Harris JD, Trinh TQ, Siston RA, Brophy RH (2010) Prevalence of chondral defects in athletes' knees: a systematic review. *Medicine and science in sports and exercise* 42:1795–1801. doi:10.1249/MSS.0b013e3181d9eea0
- Föhr P, Hautmann V, Prodinger P, Pohlig F, Kaddick C, Burgkart R (2012) Hochdynamisches Prüfsystem zur biomechanischen Charakterisierung von Knorpel und seinen Regeneraten. *Der Orthopäde* 41:820–826. doi:10.1007/s00132-012-1953-4
- Franz T, Hasler EM, Hagg R, Weiler C, Jakob RP, Mainil-Varlet P (2001) In situ compressive stiffness, biochemical composition, and structural integrity of articular cartilage of the human knee joint. *Osteoarthritis and Cartilage* 9:582–592. doi:10.1053/joca.2001.0418
- Freutel M, Schmidt H, Durselen L, Ignatius A, Galbusera F (2014) Finite element modeling of soft tissues: material models, tissue interaction and challenges. *Clinical biomechanics (Bristol, Avon)* 29:363–372. doi:10.1016/j.clinbiomech.2014.01.006
- Frisbie DD, Trotter GW, Powers BE, Rodkey WG, Steadman JR, Howard RD, Park RD, McIlwraith CW (1999) Arthroscopic subchondral bone plate microfracture technique augments healing of large chondral defects in the radial carpal bone and medial femoral condyle of horses. *Veterinary surgery : VS* 28:242–255
- Frisbie DD, Oxford JT, Southwood L, Trotter GW, Rodkey WG, Steadman JR, Goodnight JL, McIlwraith CW (2003) Early events in cartilage repair after subchondral bone microfracture. *Clinical Orthopaedics And Related Research*:215–227
- Frisbie DD, Cross MW, McIlwraith CW (2006a) A comparative study of articular cartilage thickness in the stifle of animal species used in human pre-clinical studies compared to articular cartilage thickness in the human knee. *Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology : V.C.O.T* 19:142–146
- Frisbie DD, Morisset S, Ho CP, Rodkey WG, Steadman JR, McIlwraith CW (2006b) Effects of calcified cartilage on healing of chondral defects treated with microfracture in horses. *The American journal of sports medicine* 34:1824–1831
- Fritz J, Gaissmaier C, Schewe B, Janßen P, Röhner H (2007) Der Knorpeldefekt am Kniegelenk. *Trauma Berufskrankh* 9:246–251. doi:10.1007/s10039-007-1303-7



- Gille J, Schuseil E, Wimmer J, Gellissen J, Schulz AP, Behrens P (2010) Mid-term results of Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis for treatment of focal cartilage defects in the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 18:1456–1464. doi:10.1007/s00167-010-1042-3
- Glaser C (2009) Praktisches zur präoperativen Knorpelbildung. *Radiologie up2date* 9:103–116. doi:10.1055/s-0029-1214540
- Goldsmith A, Hayes A, Clift SE (1996) Application of finite elements to the stress analysis of articular cartilage. *Medical Engineering & Physics* 18:89–98. doi:10.1016/1350-4533(95)00029-1
- Hall AC, Bush PG, Davidson MEB, Kempson SA (2003) Equine articular cartilage chondrocytes; Opening the black box. *Equine Veterinary Journal* 35:425–428. doi:10.2746/042516403775600442
- Hayes WC, Mockros LF (1971) Viscoelastic properties of human articular cartilage. *Journal of Applied Physiology* 31:562–568
- Hayes WC, Keer LM, Herrmann G, Mockros LF (1972) A mathematical analysis for indentation tests of articular cartilage. *Journal of Biomechanics* 5:541–551. doi:10.1016/0021-9290(72)90010-3
- Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M (2002) Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 18:730–734. doi:10.1053/jars.2002.32839
- Hoch DH, Grodzinsky AJ, Koob TJ, Albert ML, Eyre DR (1983) Early changes in material properties of rabbit articular cartilage after meniscectomy. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 1:4–12. doi:10.1002/jor.1100010102
- Hoemann CD, Sun J, McKee MD, Chevrier A, Rossomacha E, Rivard G-E, Hurtig M, Buschmann MD (2007) Chitosan-glycerol phosphate/blood implants elicit hyaline cartilage repair integrated with porous subchondral bone in microdrilled rabbit defects. *Osteoarthritis and Cartilage* 15:78–89. doi:10.1016/j.joca.2006.06.015
- Hurschler C, Abedian R (2013) Möglichkeiten der biomechanischen Charakterisierung von Knorpelgewebe. *Orthopäde* 42:232–241. doi:10.1007/s00132-013-2074-4
- Hyttinen MM (2001) Inactivation of one allele of the type II collagen gene alters the collagen network in murine articular cartilage and makes cartilage softer. *Annals of the Rheumatic Diseases* 60:262–268. doi:10.1136/ard.60.3.262

Imhof H, Sulzbacher I, Grampp S, Czerny C, Youssefzadeh S, Kainberger F (2000) Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit. *Investigative radiology* 35:581–588

Imhoff AB, König U (2003) Arthroskopie; Qualifizierte Stadieneinteilung der osteochondralen Läsion (OCL) am Knie. *Arthroskopie* 16:23–28. doi:10.1007/s00142-003-0209-z

Imhoff AB, Öttl GM, Burkart A, Traub S (1999) Osteochondrale autologe Transplantation an verschiedenen Gelenken. *Orthopäde* 28:33. doi:10.1007/s001320050319

International Cartilage Repair Society ICRS SCORE/GRADE | ICRS Main Site. <http://cartilage.org/society/publications/icrs-score/>. Zugegriffen: 24. März 2017

Jakobsen RB (2005) An Analysis of the Quality of Cartilage Repair Studies. *J Bone Joint Surg Am* 87:2232. doi:10.2106/JBJS.D.02904

Jerosch J, Schulz A (2003) Therapiekonzepte bei osteochondralen Läsionen und der Osteochondrosis dissecans tali. *Arthroskopie* 16:51–57. doi:10.1007/s00142-003-0204-4

Jevsevar D, Donnelly P, Brown GA, Cummins DS (2015) Viscosupplementation for Osteoarthritis of the Knee: A Systematic Review of the Evidence. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 97:2047–2060. doi:10.2106/JBJS.N.00743

Johnson LL (1986) Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective; Present status. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 2:54–69. doi:10.1016/S0749-8063(86)80012-3

Johnson LL (2001) Arthroscopic abrasion arthroplasty: a review. *Clinical Orthopaedics And Related Research*:S306-17

Julkunen P, Kiviranta P, Wilson W, Jurvelin JS, Korhonen RK (2007) Characterization of articular cartilage by combining microscopic analysis with a fibril-reinforced finite-element model. *Journal of Biomechanics* 40:1862–1870. doi:10.1016/j.jbiomech.2006.07.026

Julkunen P, Wilson W, Jurvelin JS, Rieppo J, Qu C-J, Lammi MJ, Korhonen RK (2008) Stress-relaxation of human patellar articular cartilage in unconfined compression: prediction of mechanical response by tissue composition and structure. *Journal of Biomechanics* 41:1978–1986. doi:10.1016/j.jbiomech.2008.03.026

Junqueira L, Carneiro J, Mayerhofer A, Schilling K., Richter W., Wurziger L (Hrsg) (2005) *Histologie; Mit 500 Abbildungen in 618 Einzeldarstellungen und 17 Tabellen.* Springer Medizin, Heidelberg

Jurvelin J, Kiviranta I, Arokoski J, Tammi M, Helminen HJ (1987) Indentation study of the biochemical properties of articular cartilage in the canine knee. *Engineering in medicine* 16:15–22

Jurvelin JS, Räsänen T, Kolmonen P, Lyyra T (1995) Comparison of optical, needle probe and ultrasonic techniques for the measurement of articular cartilage thickness. *Journal of Biomechanics* 28:231–235

Jurvelin JS, Buschmann MD, Hunziker EB (1997) Optical and mechanical determination of poisson's ratio of adult bovine humeral articular cartilage. *Journal of Biomechanics* 30:235–241. doi:10.1016/S0021-9290(96)00133-9

Kabus K (2013) *Mechanik und Festigkeitslehre*. Hanser, München

Knorrenschild M (2013) *Numerische Mathematik; Eine beispielorientierte Einführung ; mit 78 Beispielen und 69 Aufgaben*. Fachbuchverl. Leipzig, München

Kocher MS, Tucker R, Ganley TJ, Flynn JM (2006) Management of osteochondritis dissecans of the knee: current concepts review. *The American journal of sports medicine* 34:1181–1191. doi:10.1177/0363546506290127

Koh Y-G, Kwon O-R, Kim Y-S, Choi Y-J, Tak D-H (2016) Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells With Microfracture Versus Microfracture Alone: 2-Year Follow-up of a Prospective Randomized Trial. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 32:97–109. doi:10.1016/j.arthro.2015.09.010

Korhonen RK, Laasanen MS, Töyräs J, Rieppo J, Hirvonen J, Helminen HJ, Jurvelin JS (2002) Comparison of the equilibrium response of articular cartilage in unconfined compression, confined compression and indentation. *Journal of Biomechanics* 35:903–909

Kreuz PC, Steinwachs MR, Erggelet C, Krause SJ, Konrad G, Uhl M, Südkamp N (2006) Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 14:1119–1125. doi:10.1016/j.joca.2006.05.003

Kreuz PC (2016) Stellenwert der Knochenmarkstimulation. *Arthroskopie* 29:89–94. doi:10.1007/s00142-016-0065-2

Kroell A, Marks P, Chahal J, Hurtig M, Dwyer T, Whelan D, Theodoropoulos J (2014) Microfracture for chondral defects: assessment of the variability of surgical technique in cadavers. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*. doi:10.1007/s00167-014-3481-8

Lai WM, Hou JS, Mow VC (1991) A Triphasic Theory for the Swelling and Deformation Behaviors of Articular Cartilage. *J Biomech Eng* 113:245–258. doi:10.1115/1.2894880

Laible JP (2003) Influence of Fixed Charge Density Magnitude and Distribution on the Intervertebral Disc; Applications of a Poroelastic and Chemical Electric (PEACE) Model. *J Biomech Eng* 125:12. doi:10.1115/1.1537190

Lane JG, Healey RM, Chen AC, Sah RL, Amiel D (2010) Can osteochondral grafting be augmented with microfracture in an extended-size lesion of articular cartilage? *The American journal of sports medicine* 38:1316–1323. doi:10.1177/0363546510363433

Li LP, Soulhat J, Buschmann MD, Shirazi-Adl A (1999) Nonlinear analysis of cartilage in unconfined ramp compression using a fibril reinforced poroelastic model. *Clinical biomechanics (Bristol, Avon)* 14:673–682

Link TM, Stahl R, Woertler K (2007) Cartilage imaging: motivation, techniques, current and future significance. *European radiology* 17:1135–1146. doi:10.1007/s00330-006-0453-5

Loeser RF (2003) Systemic and local regulation of articular cartilage metabolism: Where does leptin fit in the puzzle? *Arthritis & Rheumatism* 48:3009–3012. doi:10.1002/art.11315

Lu XL, Mow VC (2008) Biomechanics of articular cartilage and determination of material properties. *Medicine and science in sports and exercise* 40:193–199. doi:10.1249/mss.0b013e31815cb1fc

Lüllmann-Rauch R (2015) Taschenbuch Histologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Mak AF, Lai WM, Mow VC (1987) Biphasic indentation of articular cartilage--I. Theoretical analysis. *Journal of Biomechanics* 20:703–714

Makela JTA, Korhonen RK (2016) Highly nonlinear stress-relaxation response of articular cartilage in indentation: Importance of collagen nonlinearity. *Journal of Biomechanics* 49:1734–1741. doi:10.1016/j.jbiomech.2016.04.002

Manger B, Schulze-Koops H, Arbogast, Dechant, Grünke, Haas, Häfner, Hellmich, Nigg, Skapenko, Tillmann, Truckenbrodt (2012) Checkliste Rheumatologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Mansour JM (2003) Biomechanics of Cartilage. *Kinesiology: The Mechanics and Pathomechanics of Human Movement*:66–79

- Marchand C, Chen G, Tran-Khanh N, Sun J, Chen H, Buschmann MD, Hoemann CD (2012) Microdrilled cartilage defects treated with thrombin-solidified chitosan/blood implant regenerate a more hyaline, stable, and structurally integrated osteochondral unit compared to drilled controls. *Tissue engineering. Part A* 18:508–519. doi:10.1089/ten.TEA.2011.0178
- Marlovits S, Vécsei V (2000) Möglichkeiten zur chirurgischen Therapie von Knorpeldefekten — Teil 2: Chirurgische Behandlungsoptionen zur biologischen Knorpelreparatur. *Acta Chir. Austriaca* 32:185–194. doi:10.1007/BF02949262
- Marlovits S, Kutscha-Lissberg F, Aldrian S, Resinger C, Singer P, Zeller P, Vecsei V (2004) Autologous chondrocyte transplantation for the treatment of articular cartilage defects in the knee joint. Techniques and results. *Der Radiologe* 44:763–772. doi:10.1007/s00117-004-1082-0
- Martinek V (2003) Anatomie und Pathophysiologie des hyalinen Knorpels. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 54:166–170
- Martinek V, Imhoff AB (2003) Therapie von Knorpelschäden. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 54:70–76
- Maurer J, Grotejohann B, Jenkner C, Schneider C, Flury T, Tassoni A, Angele P, Fritz J, Albrecht D, Niemeyer P (2016) A Registry for Evaluation of Efficiency and Safety of Surgical Treatment of Cartilage Defects: The German Cartilage Registry (KnorpelRegister DGOÜ). *JMIR research protocols* 5:e122. doi:10.2196/resprot.5895
- Methot S, Changoor A, Tran-Khanh N, Hoemann CD, Stanish WD, Restrepo A, Shive MS, Buschmann MD (2016) Osteochondral Biopsy Analysis Demonstrates That BST-CarGel Treatment Improves Structural and Cellular Characteristics of Cartilage Repair Tissue Compared With Microfracture. *Cartilage* 7:16–28. doi:10.1177/1947603515595837
- Mithoefer K, Williams R3, Warren RF, Potter HG, Spock CR, Jones EC, Wickiewicz TL, Marx RG (2006) Chondral resurfacing of articular cartilage defects in the knee with the microfracture technique. Surgical technique. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 88 Suppl 1 Pt 2:294–304. doi:10.2106/JBJS.F.00292
- Modest VE, Murphy MC, Mann RW (1989) Optical verification of a technique for in situ ultrasonic measurement of articular cartilage thickness. *Journal of Biomechanics* 22:171–176. doi:10.1016/0021-9290(89)90041-9
- Motulsky HJ, Brown RE (2006) Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression - a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC bioinformatics* 7:123. doi:10.1186/1471-2105-7-123

Mow VC, Holmes MH, Lai WM (1984) Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review. *Journal of Biomechanics* 17:377–394

Mow VC, Ratcliffe A, Poole AR (1992) Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials* 13:67–97

Muir H (1995) The chondrocyte, architect of cartilage. *Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 17:1039–1048.

doi:10.1002/bies.950171208

Müller B, Kohn D (1999) Indikation und Durchführung der Knorpel-Knochen-Anbohrung nach Pridie. *Orthopäde* 28:4. doi:10.1007/s001320050315

Murray IR, Benke MT, Mandelbaum BR (2015) Management of knee articular cartilage injuries in athletes: chondroprotection, chondrofacilitation, and resurfacing. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA.*

doi:10.1007/s00167-015-3509-8

Nehrer S (2012) Operative Knorpeltherapie im Sport- von der Mikrofrakturierung bis zum Tissue Engineering. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 63:137

Niemeyer P, Kreuz PC, Steinwachs M, Südkamp NP (2007) Chirurgische Therapieverfahren zur Behandlung umschriebener Knorpelschäden am Kniegelenk. *Sportverletzung Sportschaden : Organ der Gesellschaft für Orthopädisch-Traumatologische Sportmedizin* 21:41–50. doi:10.1055/s-2007-963030

Niemeyer P, Andereya S, Angele P, Ateschrang A, Aurich M, Baumann M, Behrens P, Bosch U, Erggelet C, Fickert S, Fritz J, Gebhard H, Gelse K, Günther D, Hoburg A, Kasten P, Kolombe T, Madry H, Marlovits S, Meenen NM, Müller PE, Nöth U, Petersen JP, Pietschmann M, Richter W, Rolauffs B, Rhunau K, Schewe B, Steinert A, Steinwachs MR, Welsch GH, Zinser W, Albrecht D (2013) Stellenwert der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) in der Behandlung von Knorpelschäden des Kniegelenks - Empfehlungen der AG Klinische Geweberegeneration der DGOU. *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie* 151:38–47. doi:10.1055/s-0032-1328207

Niemeyer P, Schweigler K, Grotejohann B, Maurer J, Angele P, Aurich M, Becher C, Fay J, Feil R, Fickert S, Fritz J, Hoburg A, Kreuz P, Kolombe T, Laskowski J, Lützner J, Marlovits S, Müller PE, Niethammer T, Pietschmann M, Ruhna K, Spahn G, Tischler T, Zinser W, Albrecht D (2015) Das KnorpelRegister DGOU zur Erfassung von Behandlungsergebnissen nach Knorpeloperationen: Erfahrungen nach 6 Monaten und erste epidemiologische Daten. *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie* 153:67–74. doi:10.1055/s-0034-1383222

- Niemeyer P, Feucht MJ, Fritz J, Albrecht D, Spahn G, Angele P (2016) Cartilage repair surgery for full-thickness defects of the knee in Germany: indications and epidemiological data from the German Cartilage Registry (KnorpelRegister DGOU). *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. doi:10.1007/s00402-016-2453-5
- Norrdin RW, Kawcak CE, Capwell BA, McIlwraith CW (1999) Calcified cartilage morphology and its relation to subchondral bone remodeling in equine arthrosis. *Bone* 24:109–114
- Orth P, Goebel L, Wolfram U, Ong MF, Graber S, Kohn D, Cucchiarini M, Ignatius A, Pape D, Madry H (2012) Effect of subchondral drilling on the microarchitecture of subchondral bone: analysis in a large animal model at 6 months. *The American journal of sports medicine* 40:828–836. doi:10.1177/0363546511430376
- Orth P, Kohn D, Madry H (2016a) Degenerative Kniegelenkerkrankungen – Gonarthrose. *Orthopädie und Unfallchirurgie up2date* 11:81–98. doi:10.1055/s-0041-108361
- Orth P, Duffner J, Zurakowski D, Cucchiarini M, Madry H (2016b) Small-Diameter Awls Improve Articular Cartilage Repair After Microfracture Treatment in a Translational Animal Model. *The American journal of sports medicine* 44:209–219. doi:10.1177/0363546515610507
- Osterhoff G, Loffler S, Steinke H, Feja C, Josten C, Hepp P (2011) Comparative anatomical measurements of osseous structures in the ovine and human knee. *The Knee* 18:98–103. doi:10.1016/j.knee.2010.02.001
- Outerbridge RE (1961) The etiology of chondromalacia patellae. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 43-B:752–757
- Palmer AW, Guldberg RE, Levenston ME (2006) Analysis of cartilage matrix fixed charge density and three-dimensional morphology via contrast-enhanced microcomputed tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:19255–19260. doi:10.1073/pnas.0606406103
- Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund EL, Lindahl A (2002) Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *The American journal of sports medicine* 30:2–12
- Pot MW, Gonzales VK, Buma P, IntHout J, van Kuppevelt TH, Vries RBM de, Daamen WF (2016) Improved cartilage regeneration by implantation of acellular biomaterials after bone marrow stimulation: a systematic review and meta-analysis of animal studies. *PeerJ* 4:e2243. doi:10.7717/peerj.2243

- Pridie K. H. (1959) A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *Journal of Bone and Joint Surgery [ Br ]*:618–619
- Proffen B, Keudell A von, Vavken P (2012) Evidenzbasierte Knorpeltherapie im Kniegelenk - regenerative Behandlungsoptionen. *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie* 150:280–289. doi:10.1055/s-0031-1298387
- Putz R (2008) Aufbau und Funktion des Gelenkknorpels. *Akt Rheumatol* 33:22–28. doi:10.1055/s-2007-963753
- Resinger C, Vecsei V, Marlovits S (2004) Therapeutic options in the treatment of cartilage defects. Techniques and indications. *Der Radiologe* 44:756–762. doi:10.1007/s00117-004-1081-1
- Rodriguez-Merchan EC (2013) Regeneration of articular cartilage of the knee. *Rheumatology international* 33:837–845. doi:10.1007/s00296-012-2601-3
- Rudert M, Hirschmann F, Wirth CJ (1999) Wachstumsverhalten von Chondrozyten auf unterschiedlichen Trägersubstanzen. *Orthopäde* 28:68. doi:10.1007/s001320050323
- Rushfeldt PD, Mann RW, Harris WH (1981) Improved techniques for measuring in vitro the geometry and pressure distribution in the human acetabulum—I. Ultrasonic measurement of acetabular surfaces, sphericity and cartilage thickness. *Journal of Biomechanics* 14:253–260. doi:10.1016/0021-9290(81)90070-1
- Sawitzke AD, Shi H, Finco MF, Dunlop DD, Harris CL, Singer NG, Bradley JD, Silver D, Jackson CG, Lane NE, Oddis CV, Wolfe F, Lisse J, Furst DE, Bingham CO, Reda DJ, Moskowitz RW, Williams HJ, Clegg DO (2010) Clinical efficacy and safety of glucosamine, chondroitin sulphate, their combination, celecoxib or placebo taken to treat osteoarthritis of the knee; 2-year results from GAIT. *Annals of the Rheumatic Diseases* 69:1459–1464. doi:10.1136/ard.2009.120469
- Schewe B, Fritz J, Weise K (2008) Knorpelverletzungen am Kniegelenk. *Orthopädie und Unfallchirurgie up2date* 3:77–94. doi:10.1055/s-2007-995662
- Schindelin J, Rueden CT, Hiner MC, Eliceiri KW (2015) The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Molecular Reproduction and Development* 82. doi:10.1002/mrd.22489
- Schinhan M, Gruber M, Vavken P, Dorotka R, Samouh L, Chiari C, Gruebl-Barabas R, Nehrer S (2012) Critical-size defect induces unicompartmental osteoarthritis in a stable ovine knee. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 30:214–220. doi:10.1002/jor.21521



- Schneider-Wald B, Thaden Av, Schwarz M (2013) Defektmodelle für die Gelenkknorpelregeneration im Großtier. *Orthopäde* 42:242–253. doi:10.1007/s00132-012-2044-2
- Spahn G, Fritz J, Albrecht D, Hofmann GO, Niemeyer P (2016) Characteristics and associated factors of Klee cartilage lesions: preliminary baseline-data of more than 1000 patients from the German cartilage registry (KnorpelRegister DGOU). *Archives of orthopaedic and trauma surgery* 136:805–810. doi:10.1007/s00402-016-2432-x
- Statistisches Bundesamt (2015) Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik) Diagnosen, Prozeduren, Fallpauschalen und Case Mix der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern; Fachserie 12 Reihe 6.4 - 2014
- Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ (1999) Die Technik der Mikrofrakturierung zur Behandlung von kompletten Knorpeldefekten im Kniegelenk. *Orthopäde* 28:26. doi:10.1007/s001320050318
- Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ (2001) Microfracture: Surgical Technique and Rehabilitation to Treat Chondral Defects. *Clinical Orthopaedics And Related Research*:362–369
- Steadman JR, Rodkey WG, Singleton SB, Briggs KK (1997) Microfracture technique for full-thickness chondral defects; Technique and clinical results. *Operative Techniques in Orthopaedics* 7:300–304. doi:10.1016/S1048-6666(97)80033-X
- Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK (2010) Microfracture: Its History and Experience of the Developing Surgeon. *Cartilage* 1:78–86. doi:10.1177/1947603510365533
- Steinwachs M, Wopperer S, Salzmann G, Waibl B (2014) Regenerative Knorpeltherapie. *Orthopädie und Unfallchirurgie up2date* 9:279–301. doi:10.1055/s-0033-1357981
- Steinwachs MR, Waibl B, Niemeyer P (2011) Klinische Behandlung von Gelenkknorpelschäden mithilfe autologer Vorläuferzellen. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 54:797–802. doi:10.1007/s00103-011-1302-5
- Töyräs J, Rieppo J, Nieminen MT, Helminen HJ, Jurvelin JS (1999) Characterization of enzymatically induced degradation of articular cartilage using high frequency ultrasound. *Physics in medicine and biology* 44:2723–2733
- Töyräs J, Laasanen MS, Saarakkala S, Lammi MJ, Rieppo J, Kurkijärvi J, Lappalainen R, Jurvelin JS (2003) Speed of sound in normal and degenerated bovine articular cartilage. *Ultrasound in Medicine & Biology* 29:447–454. doi:10.1016/S0301-5629(02)00708-1
- van der Kraan PM, Buma P, van Kuppevelt T, van den Berg WB (2002) Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors; Relevance for articular cartilage

tissue engineering. *Osteoarthritis and Cartilage* 10:631–637.

doi:10.1053/joca.2002.0806

Vannini F, Spalding T, Andriolo L, Berruto M, Denti M, Espregueira-Mendes J, Mene-trey J, Peretti GM, Seil R, Filardo G (2016) Sport and early osteoarthritis; The role of sport in aetiology, progression and treatment of knee osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* doi:10.1007/s00167-016-4090-5

Vanwansseele B, Lucchinetti E, Stüssi E (2002) The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions. *Osteoarthritis and Cartilage* 10:408–419. doi:10.1053/joca.2002.0529

Welsch U (Hrsg) (2006) *Lehrbuch Histologie; Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie* : mit 823 Abbildungen und 21 Tabellen. Elsevier Urban & Fischer, München

Welsch F, Stein T, Minzlaff P, Hoffmann R (2016) Kniegelenktrauma mit Knorpelab-scherverletzung. *Trauma Berufskrankh* 18:18–25. doi:10.1007/s10039-015-0050-4

Widuchowski W, Widuchowski J, Trzaska T (2007) Articular cartilage defects: study of 25,124 knee arthroscopies. *The Knee* 14:177–182. doi:10.1016/j.knee.2007.02.001

Wondrasch B (2016) Rückkehr zum Sport nach Eingriffen am Gelenkknorpel im Knie-gelenk. *Arthroskopie* 29:108–115. doi:10.1007/s00142-016-0068-z

Zedde P, Cudoni S, Giachetti G, Manunta ML, Masala G, Brunetti A, Manunta AF (2016) Subchondral bone remodeling: comparing nanofracture with microfracture. An ovine in vivo study. *Joints* 4:87–93. doi:10.11138/jts/2016.4.2.087

Zhang M, Zheng YP, Mak AF (1997) Estimating the effective Young's modulus of soft tissues from indentation tests—nonlinear finite element analysis of effects of friction and large deformation. *Medical Engineering & Physics* 19:512–517.

doi:10.1016/S1350-4533(97)00017-9

Zilkens C, Jager M, Bittersohl B, Dudda M, Millis MB, Kim Y-J, Muhr G, Krauspe R, Mamisch TC (2009) "Delayed Gadolinium Enhanced MRI of Cartilage" (dGEMRIC): Molekulare MRT-Bildgebung des Hüftgelenkknorpels. *Der Orthopäde* 38:591–599.

doi:10.1007/s00132-009-1441-7

## 9 Publikationen

Vortrag am 07.03.2015: V. Münchener Symposium für experimentelle Orthopädie, Unfallchirurgie und muskuloskelettale Forschung

„Systematische Analyse von Regeneratknorpel nach operativer Behandlung mit Mikrofrakturierung und Anbohrung – Ein biomechanischer Vergleich nach 12 Monaten im Schafsmodell“

*M. Wittek, P. Föhr, F. Pohlig, P. Prodingler, C. von Deimling, J. Tübel, R. Burgkart*

Poster am 20.10.2015: Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, Berlin

„Vergleich von Mikrofrakturierung vs. Anbohrung im Schafsmodell nach einer Standzeit von 12 Monaten“

*P. Föhr, M. Wittek, F. Pohlig, P. Prodingler, C. von Deimling, R. v. Eisenhart-Rothe, R. Burgkart*

## Anhang

Die beigefügte CD beinhaltet eine digitale Kopie der Dissertationsschrift sowie Rohdaten aller in der Arbeit enthaltenen Messungen und deren Auswertungen.

Die einzelnen Werte der Versuchsproben aus der biomechanischen Prüfung sowie der Messung der prozentualen Defektfüllung werden darüber hinaus in den folgenden Tabellen dargestellt (Tabelle 10 und 11). R-Quadrat ist dabei der Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden im linearen Bereich des Spannungs-Dehnungs-Diagramms,  $E_{\text{measured}}$  ist die Steigung der Regressionsgeraden im Spannungs-Dehnungs-Diagramm und E-Modul ist der nach Töyräs berechnete Elastizitätsmodul (Töyräs et al. 1999). § markiert einen extrapolierten Wert für den Skalierungsfaktor  $\kappa$ , der außerhalb des angegebenen Wertebereiches für  $\kappa$  liegt und deshalb die Berechnung des E-Moduls für diese Versuchsprobe verhindert. # markiert einen mit der ROUT-Methode identifizierten und eliminierten Ausreißer innerhalb der Gruppe der Messwerte.

*Tabelle 10: Wertetabelle der biomechanischen Prüfung für die einzelnen Versuchsproben.*

TUM Code	Gruppe	Knorpeldicke h, mm	Skalierungsfaktor $\kappa$ (Zhang '97)	R-Quadrat, %	$E_{\text{measured}}$ , MPa	E-Modul E, MPa	$F_{\text{peak}}/F_{\text{equil}}$ , N/N
mif01rak	Nativ	1,201	1,377	98,10	4,142	1,559	1,543
mif02lak	Nativ	0,851	1,551	97,30	1,894	0,892	1,562
mif03lak	Nativ	0,651	1,739	99,01	0,537	0,295	1,739
mif04rak-1	Nativ	0,620	1,782	99,17	1,834	1,032	1,900
mif05lak	Nativ	0,297	2,899	99,52	0,397	0,287	1,537
mif06rpk-1	Nativ	0,964	1,480	99,62	0,798	0,348	1,417
mif07lab34	Nativ	0,462	2,097	94,24	0,190	0,122	# 4,467
mif08rab34	Nativ	1,020	1,451	97,61	3,207	1,348	1,702
mif09lab34	Nativ	0,837	1,561	97,00	1,378	0,656	2,257
mif10lab34	Nativ	0,765	1,620	99,74	1,413	0,710	1,424
mif11rpb34-1	Nativ	1,154	1,394	97,94	2,172	0,840	1,574
mif12p34-1	Nativ	0,985	1,469	98,70	2,003	0,861	1,824
mif13lam34	Nativ	0,463	2,094	99,39	0,610	0,391	1,505
mif14rab34	Nativ	0,588	1,831	98,76	1,493	0,863	1,954
mif15lam32	Nativ	0,972	1,476	98,58	1,558	0,676	1,756
mif16ram34	Nativ	0,522	1,952	97,12	0,553	0,338	1,978
mif17lam34	Nativ	0,480	2,049	98,09	0,188	0,119	1,788
mif18ram34	Nativ	0,480	2,049	99,41	0,645	0,408	1,646
mif19ram32	Nativ	0,838	1,561	98,45	0,508	0,242	1,613
mif20lam32	Nativ	0,539	1,918	98,96	1,211	0,729	2,100
mif21ram32	Nativ	0,621	1,781	98,92	1,315	0,740	1,638
mif22lam32	Nativ	0,533	1,930	99,36	0,940	0,569	2,091
mif23ram32	Nativ	0,349	2,550	99,61	0,530	0,371	1,295
mif24lam32	Nativ	0,873	1,536	99,78	2,057	0,954	1,723

TUM Code	Gruppe	Knorpel- dicke h, mm	Skalierungs- faktor κ (Zhang '97)	R-Quad- rat, %	E <sub>measured</sub> , MPa	E-Modul E, MPa	F <sub>peak</sub> /F <sub>equil</sub> , N/N
mif25rab64	Nativ	0,635	1,761	99,71	1,666	0,927	1,858
mif26rab64	Nativ	0,254	3,291	98,50	0,379	0,282	1,334
mif27lab64	Nativ	0,690	1,693	99,91	1,136	0,605	1,378
mif28rab64-1	Nativ	0,423	2,215	98,92	0,809	0,537	1,452
mif29lab64	Nativ	0,665	1,721	98,97	1,250	0,679	2,067
mif30lab64	Nativ	0,772	1,613	98,58	0,849	0,424	1,893
mif31ram34	Nativ	0,275	3,087	99,67	0,273	0,200	2,065
mif32rab34	Nativ	0,820	1,574	99,75	2,037	0,982	1,623
mif33rab34	Nativ	0,471	2,072	99,44	1,074	0,684	1,908
mif19ram32	M3x2	0,471	2,072	94,46	0,064	0,041	2,625
mif19rpm32	M3x2	0,449	2,134	94,14	0,031	0,020	1,194
mif20lam32	M3x2	0,322	2,717	98,46	0,751	0,534	2,389
mif20lpm32	M3x2	0,856	1,548	99,03	0,263	0,123	1,648
mif21ram32	M3x2	0,223	3,655	97,95	34,405	# 26,257	1,184
mif21rpm32	M3x2	0,635	1,761	96,69	0,497	0,276	1,803
mif22lam32	M3x2	0,047	§ 14,846	84,38	0,015	-	1,500
mif22lpm32	M3x2	0,522	1,952	99,50	1,474	# 0,900	3,811
mif23ram32	M3x2	0,336	2,627	96,70	0,081	0,057	1,270
mif23rpm32	M3x2	0,297	2,899	96,95	0,301	0,217	1,821
mif24lam32	M3x2	0,576	1,851	98,54	0,233	0,136	3,102
mif24lpm32	M3x2	0,411	2,256	94,12	0,022	0,014	1,500
mif12lpm34-1	M3x4	0,873	1,536	98,65	0,127	0,059	1,621
mif12lpm34-2	M3x4	0,876	1,534	96,19	0,119	0,055	2,117
mif13lam34	M3x4	0,449	2,134	98,76	0,117	0,076	1,379
mif13lpm34	M3x4	0,828	1,568	99,18	0,089	0,043	1,639
mif15lam32	M3x4	0,323	2,711	99,53	0,734	0,521	1,827
mif15lpm32	M3x4	0,377	2,402	91,48	0,021	0,014	1,333
mif16rpm34	M3x4	0,463	2,094	95,03	0,026	0,017	1,500
mif16rpm34	M3x4	0,651	1,739	97,36	0,058	0,032	1,317
mif17lam34	M3x4	0,305	2,838	99,26	0,193	0,139	1,892
mif17lpm34	M3x4	0,325	2,698	98,99	0,322	0,229	1,622
mif18ram34	M3x4	0,340	2,603	91,76	0,232	0,163	# 5,944
mif18rpm34	M3x4	0,873	1,536	99,83	3,228	# 1,498	2,913
mif31ram34	M3x4	0,289	2,964	98,34	0,758	0,551	# 3,919
mif31rpm34	M3x4	0,490	2,023	98,19	0,489	0,307	1,780
mif07lab34	B3x4	0,204	3,934	97,90	0,229	0,177	2,006
mif07lpb34	B3x4	0,325	2,698	98,23	0,621	0,441	1,767
mif08rab34	B3x4	0,695	1,687	97,44	1,039	0,551	4,462
mif08rpb34	B3x4	0,820	1,574	92,16	2,892	1,394	3,376
mif09lab34	B3x4	0,593	1,823	95,78	1,547	0,890	2,234
mif09lpb34	B3x4	0,654	1,735	96,49	0,746	0,409	1,807
mif10lab34	B3x4	0,609	1,799	95,47	0,430	0,244	1,545
mif10lpb34	B3x4	0,471	2,072	99,45	1,752	1,117	5,691
mif11rpb34-1	B3x4	0,789	1,599	96,19	1,986	0,979	2,296
mif11rpb34-2	B3x4	# 1,605	1,271	98,06	0,083	0,025	1,738
mif14rab34	B3x4	0,504	1,990	95,79	1,238	0,768	3,035
mif14rpb34	B3x4	0,635	1,761	91,79	1,784	0,992	2,513
mif32rab34	B3x4	0,635	1,761	98,82	1,339	0,745	3,322

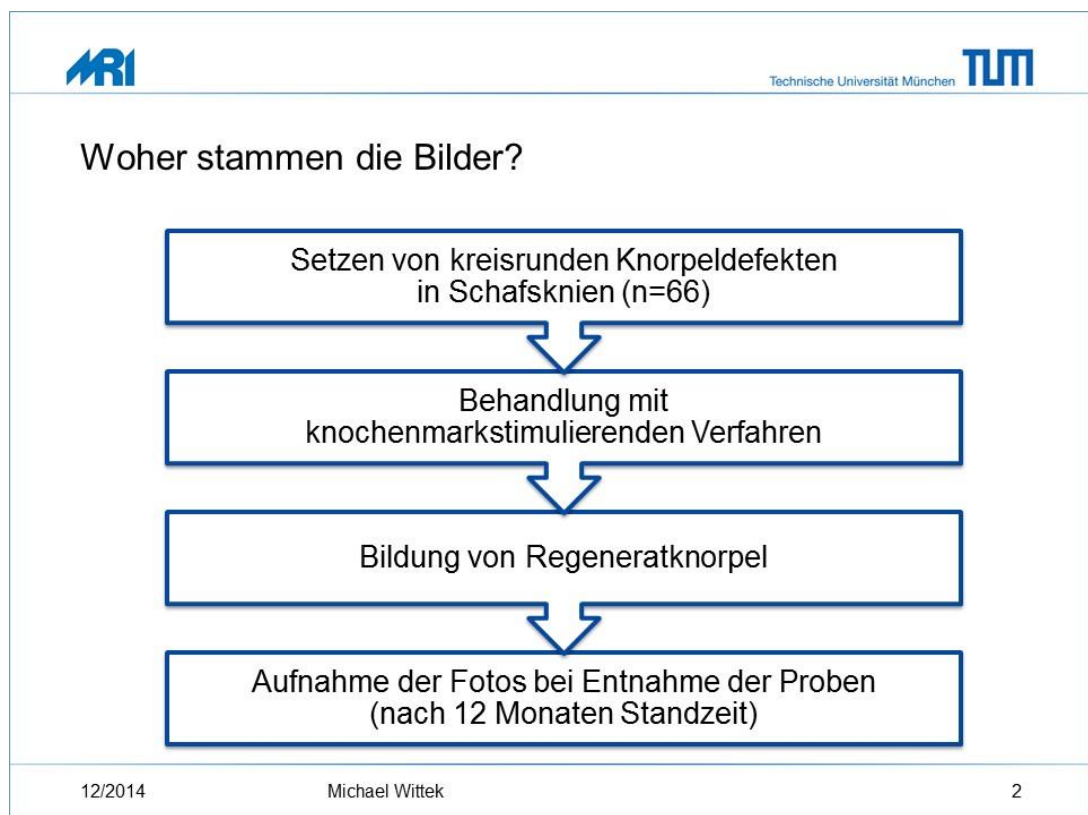
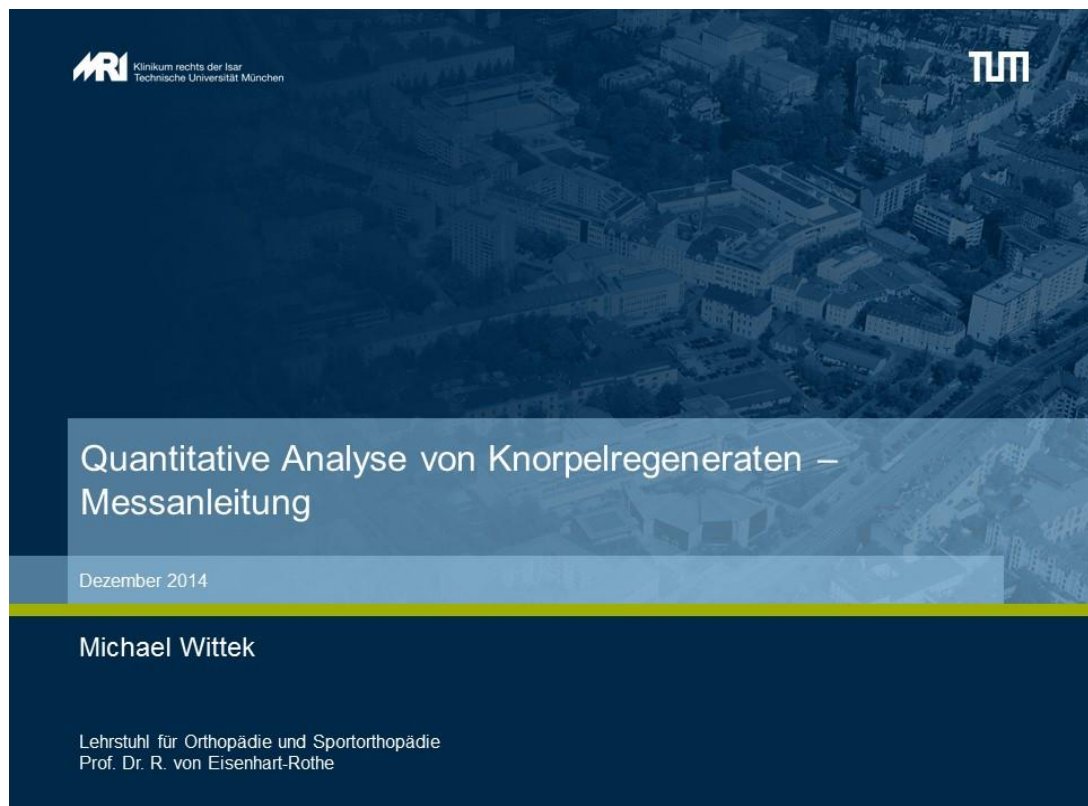
TUM Code	Gruppe	Knorpel- dicke h, mm	Skalierungs- faktor $\kappa$ (Zhang '97)	R-Quad- rat, %	$E_{\text{measured}}$ , MPa	E-Modul E, MPa	$F_{\text{peak}}/F_{\text{equil}}$ , N/N
mif32rpb34	B3x4	0,565	1,870	99,25	1,978	1,164	3,476
mif33rab34	B3x4	0,513	1,971	95,80	1,540	0,948	6,250
mif33rpb34	B3x4	0,371	2,432	89,37	0,705	0,486	2,317
mif25rab64	B6x4	0,485	2,036	93,64	1,117	0,704	2,673
mif25rpb64	B6x4	0,767	1,618	96,52	1,850	0,928	2,708
mif26rab64	B6x4	0,138	§ 5,496	98,81	0,295	-	1,750
mif26rpb64	B6x4	0,362	2,479	98,71	1,407	0,975	2,572
mif27lab64	B6x4	0,801	1,589	97,97	0,309	0,151	1,368
mif27lpb64	B6x4	0,485	2,036	97,34	0,518	0,326	4,301
mif28rab64-1	B6x4	0,449	2,134	96,96	0,855	0,555	2,372
mif28rab64-2	B6x4	0,396	2,314	97,39	1,317	0,895	3,910
mif29lab64	B6x4	0,235	3,503	95,46	0,723	0,546	3,111
mif29lpb64	B6x4	0,724	1,658	98,90	2,656	1,377	3,040
mif30lab64	B6x4	0,304	2,845	99,41	0,119	0,086	1,778
mif30lpb64	B6x4	0,730	1,652	96,93	1,405	0,725	2,295

Tabelle 11: Messwerte der quantitativen Defektfüllung für die einzelnen Versuchsproben.

TUM Code	Gruppe	Quantitative Defektfüllung, %
mif19ram32	M3x2	55,28%
mif19rpm32	M3x2	59,58%
mif20lam32	M3x2	71,24%
mif20lpm32	M3x2	87,54%
mif21ram32	M3x2	51,31%
mif21rpm32	M3x2	63,23%
mif22lam32	M3x2	60,59%
mif22lpm32	M3x2	68,04%
mif23ram32	M3x2	48,15%
mif23rpm32	M3x2	48,92%
mif24lam32	M3x2	77,95%
mif24lpm32	M3x2	85,12%
mif12lpm34-1	M3x4	71,44%
mif12lpm34-2	M3x4	72,45%
mif13lam34	M3x4	71,75%
mif13lpm34	M3x4	74,26%
mif15lam32	M3x4	75,62%
mif15lpm32	M3x4	79,37%
mif16rpm34	M3x4	66,56%
mif16rpb34	M3x4	76,24%
mif17lam34	M3x4	57,33%
mif17lpm34	M3x4	62,29%
mif18ram34	M3x4	45,96%
mif18rpm34	M3x4	69,73%
mif31ram34	M3x4	70,58%
mif31rpm34	M3x4	96,45%
mif07lab34	B3x4	57,16%

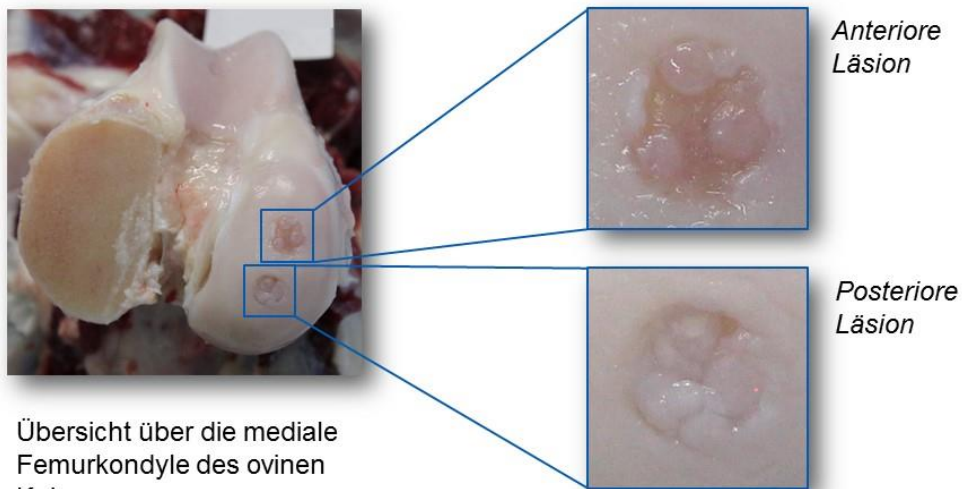
TUM Code	Gruppe	Quantitative Defektfüllung, %
mif07lpb34	B3x4	65,52%
mif08rab34	B3x4	66,68%
mif08rpb34	B3x4	85,48%
mif09lab34	B3x4	92,01%
mif09lpb34	B3x4	83,46%
mif10lab34	B3x4	64,46%
mif10lpb34	B3x4	70,94%
mif11rpb34-1	B3x4	87,41%
mif11rpb34-2	B3x4	84,73%
mif14rab34	B3x4	64,97%
mif14rpb34	B3x4	71,14%
mif32rab34	B3x4	85,88%
mif32rpb34	B3x4	85,06%
mif33rab34	B3x4	86,42%
mif33rpb34	B3x4	94,95%
mif25rab64	B6x4	89,72%
mif25rpb64	B6x4	85,47%
mif26rab64	B6x4	80,54%
mif26rpb64	B6x4	80,14%
mif27lab64	B6x4	73,42%
mif27lpb64	B6x4	80,95%
mif28rab64-1	B6x4	75,52%
mif28rab64-2	B6x4	87,44%
mif29lab64	B6x4	89,16%
mif29lpb64	B6x4	91,83%
mif30lab64	B6x4	80,96%
mif30lpb64	B6x4	94,90%
mif01rak	K	58,76%
mif01rpk	K	46,50%
mif02lak	K	51,24%
mif02lpk	K	43,10%
mif03lak	K	43,19%
mif03lpk	K	58,42%
mif04rak-1	K	39,09%
mif04rak-2	K	41,47%
mif05lak	K	40,74%
mif05lpk	K	31,11%
mif06rpk-1	K	42,83%
mif06rpk-2	K	53,36%

Abbildung 40: Benutzeranleitung zur Bestimmung der quantitativen Defektfüllung mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ





Woher stammen die Bilder?



Übersicht über die mediale Femurkondyle des ovinen Knies

12/2014

Michael Wittek

3

Was ist auf den Bildern zu erkennen?

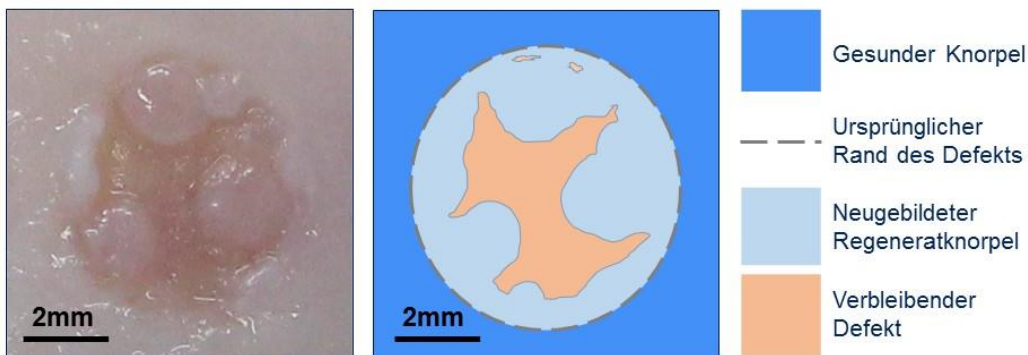


Foto eines Knorpeldefektes, der teilweise mit Regeneratknorpel aufgefüllt wurde

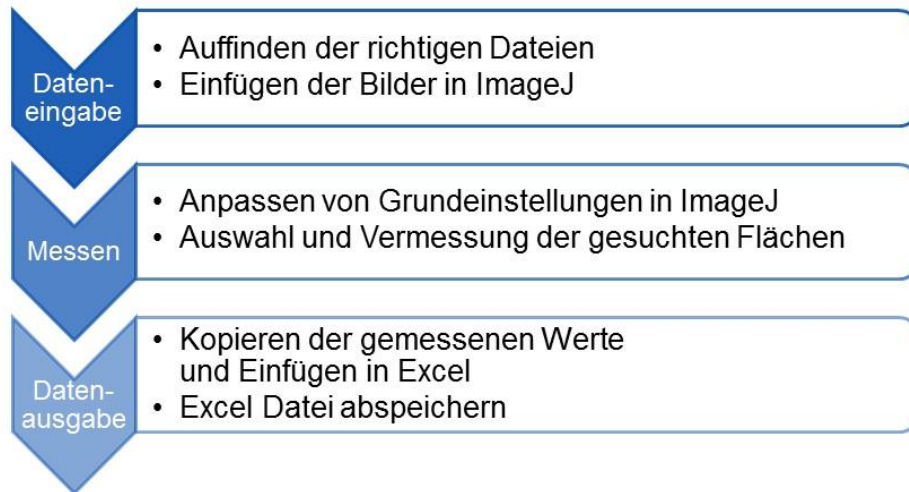
Schematische Darstellung (gleicher Ausschnitt wie links)

12/2014

Michael Wittek

4

## Der Ablauf der Messung – Schritt für Schritt



12/2014

Michael Wittek

5

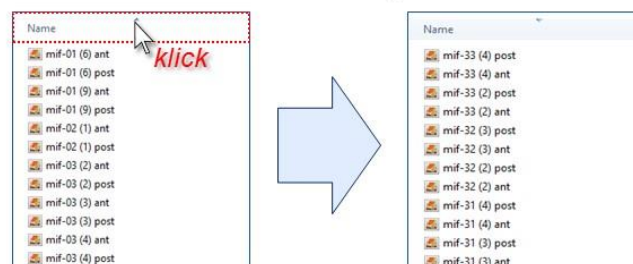
### Dateneingabe

1. Öffnen Sie den Ordner „PicsForImageJ“.

Dieser PC > or1 (\\nas.ads.mwn.de:TUM) (P:) > biomech\_share > wittek > Projekt Regeneratknorpel > Versuche > Knorpelfüllung



2. Drehen Sie mit einem Klick auf „Name“ die Reihenfolge der Dateien um.



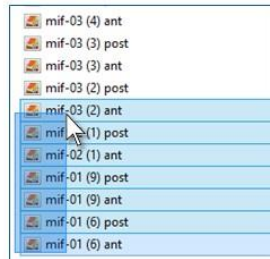
12/2014

Michael Wittek

6

## Daten- eingabe

3. Scrollen Sie zum Ende des Ordners und wählen Sie so viele Bilder aus wie Sie in dieser Runde analysieren wollen – beginnend mit „mif-01 (6) ant“.



4. Öffnen Sie ImageJ.
5. Sie können die Bilder nun mittels „Drag and Drop“ in ImageJ öffnen. Sie werden sehen, dass ImageJ die Bilder aufeinander stapelt und dabei die Reihenfolge ändert, sodass „mif-01 (6) ant“ wieder an oberster Stelle erscheint.

12/2014

Michael Wittek

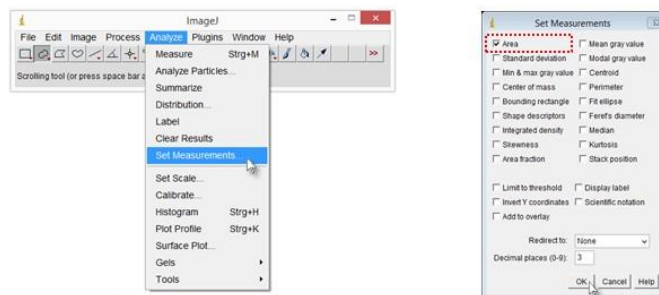
7

## Daten- eingabe

## Messen

Bevor Sie mit den Messungen beginnen können, müssen zunächst zwei Grundeinstellungen von ImageJ angepasst werden:

1. Klicken Sie auf „Analyse“ und dann auf „Set Measurements...“. Ein neues Fenster erscheint. Hier wählen Sie nur „Area“ aus und klicken danach auf „OK“.



12/2014

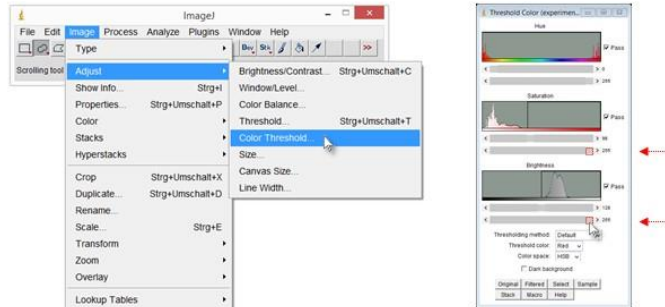
Michael Wittek

8

Daten-  
eingeabe

Messen

2. Wählen Sie als nächstes „Image“, „Adjust“ und dann „Color Threshold“. Ein neues Fenster erscheint.



Indem man die oberen Grenzen der Sättigung („Saturation“) und der Helligkeit („Brightness“) auf ein Maximum stellt, werden die zukünftigen Einstellungen schneller gehen.

12/2014

Michael Wittek

9

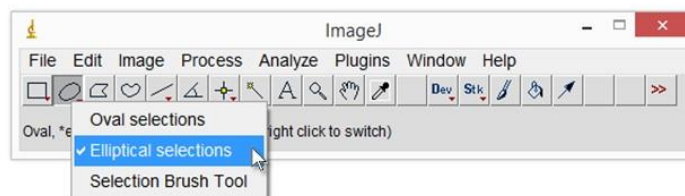
Daten-  
eingeabe

Messen

Nun können Sie mit den Messungen beginnen!

Als erstes wird die Fläche der ursprünglichen Läsion bestimmt.

Um das zu tun, klicken Sie mit der rechten Maustaste auf die zweite Schaltfläche der unteren Menüleiste und wählen „Elliptical selections“.



12/2014

Michael Wittek

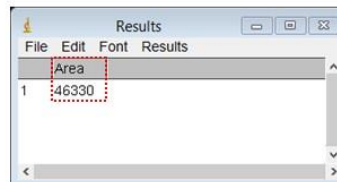
10

Daten-  
eingabe

Messen

Zeichnen Sie eine Ellipse wo Sie den zirkulären Rand des ursprünglichen Defekts erwarten.

Danach drücken Sie „Strg+M“ und ein neues Fenster erscheint, das Ihnen die Fläche der ursprünglichen Läsion ausgibt (in Pixel).



12/2014

Michael Wittek

11

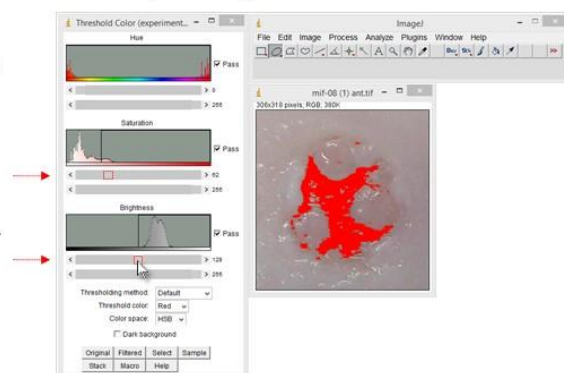
Daten-  
eingabe

Messen

Das nächste Ziel wird es sein, die Fläche innerhalb der Läsion zu messen, die nicht neu gefüllt wurde.

Hierfür wird mit der Einstellung eines Schwellwerts eine Auswahl getätigt, die im Anschluss noch durch kleinere manuelle Anpassungen verfeinert wird.

Versuchen Sie nun also möglichst nur die nicht-gefüllte Fläche auszuwählen, indem Sie die unteren Schwellwerte für Sättigung („Saturation“) und Helligkeit („Brightness“) anpassen.



12/2014

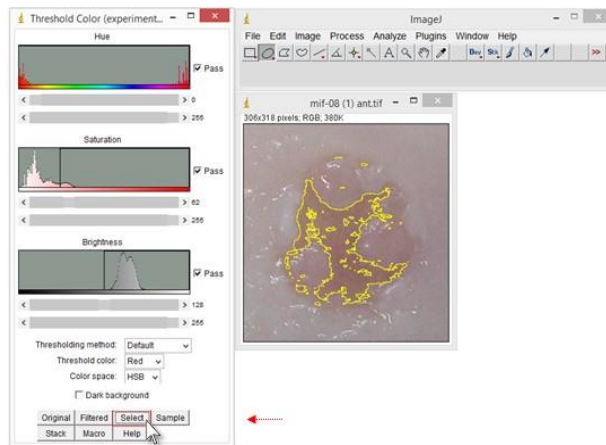
Michael Wittek

12

Daten-  
eingabe

Messen

Wenn Sie mit Ihrer Auswahl zufrieden sind, klicken Sie auf „Select“.



12/2014

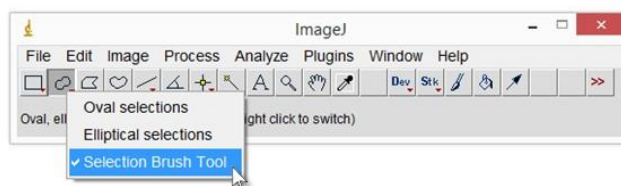
Michael Wittek

13

Daten-  
eingabe

Messen

Die mittels Schwellwert ermittelte Fläche wird oft noch weitere Anpassungen benötigen. Zum Beispiel können Lichtreflexe der feuchten Oberfläche die Messung verfälschen. Um der Auswahl Bereiche hinzuzufügen oder zu löschen, klicken Sie mit der rechten Maustaste auf die zweite Schaltfläche der unteren Menüleiste und wählen „Selection Brush Tool“.



12/2014

Michael Wittek

14

Daten-  
eingabe

Messen

Wenn alle Anpassungen abgeschlossen sind, drücken Sie erneut „Strg+M“ um die Fläche zu messen, die nicht mit Regeneratknorpel gefüllt wurde. ImageJ fügt eine neue Zeile mit der zweiten Fläche zu den Ergebnissen hinzu.



Results			
File	Edit	Font	Results
Area			
1	46330		
2	12115		

12/2014

Michael Wittek

15

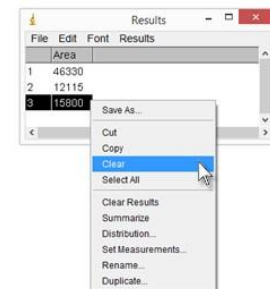
Daten-  
eingabe

Messen

Daten-  
ausgabe

Für die richtige Ausgabe der Daten ist es sehr wichtig, dass Sie die folgenden Hinweise beachten!

- Führen Sie immer zwei Messungen pro Probe aus - und nicht mehr.  
 Man kann einzelne Werte löschen indem man sie auswählt, mit der rechten Maustaste erneut anklickt und „Clear“ wählt.
- Führen Sie als erstes immer die elliptische Messung durch und als zweites Messung mit dem Schwellwert.  
 Halten Sie sich bitte an diese Reihenfolge.



Die Messungen können nur auf diese Weise fehlerfrei auf die Proben zurückbezogen werden.

12/2014

Michael Wittek

16

Daten-  
eingeabe

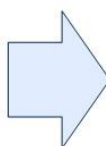
Messen

Daten-  
ausgabe

Um die Ergebnisse aus ImageJ zu extrahieren, drücken Sie einfach im Ergebnissenfenster „Strg+A“ und „Strg+C“.

Öffnen Sie das Excel Dokument „JJJJ-MM-TT-Nachname-WerteDefektfüllung“, klicken Sie auf die Zelle B2 und drücken Sie „Strg+V“.

	A	B	C
1	Dateiname	Auswahl	Fläche, px
2	mif-01 (6) ant	Elliptisch	-
3	mif-01 (6) ant	Schwellwert	-
4	mif-01 (6) post	Elliptisch	-
5	mif-01 (6) post	Schwellwert	-
6	mif-01 (9) ant	Elliptisch	-
7	mif-01 (9) ant	Schwellwert	-



	A	B	C
1	Dateiname	Auswahl	Fläche, px
2	mif-01 (6) ant	1	46330
3	mif-01 (6) ant	2	12115
4	mif-01 (6) post	Elliptisch	-
5	mif-01 (6) post	Schwellwert	-
6	mif-01 (9) ant	Elliptisch	-
7	mif-01 (9) ant	Schwellwert	-

Vergessen Sie nicht, die Datei unter einem neuen Namen (mit Ihrem Nachnamen und dem Datum versehen) in dem übergeordneten Ordner „Knorpelfüllung“ abzuspeichern.

12/2014

Michael Wittek

17

## Vielen Dank für Ihre Unterstützung!

### Kontakt

Michael Wittek  
 Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie  
 Ismaninger Straße 22  
 81675 München  
 E-Mail: michael.wittek@tum.de  
 Tel.: 089/4140-7875



# Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Labor für Biomechanik des Lehrstuhls für Orthopädie und Sportorthopädie des Klinikums rechts der Isar der TU München.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Rainer Burgkart für das entgegengebrachte Vertrauen sowie für die allzeit kollegiale, motivierende und konstruktive Zusammenarbeit bedanken. Für die Benutzung der Räumlichkeiten und Verwendung der Ressourcen bedanke ich mich bei dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie Univ.-Prof. Dr. med. Rüdiger von Eisenhart-Rothe. Des Weiteren danke ich Herrn Dr. med. Peter Prodingler und Herrn Dr. med. Florian Pohlig für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit, die Bereitstellung der Präparate und die Unterstützung bei der Anfertigung der Dissertationsschrift.

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Dipl.-Ing. Peter Föhr für die vielen hilfreichen Anregungen sowie für seine unermüdliche Unterstützung bei jeglichen Fragen und Herausforderungen, die während der Zusammenarbeit aufkamen. Ich möchte diesen Weg nutzen, ihm für seinen weiteren wissenschaftlichen, beruflichen und privaten Werdegang alles Gute zu wünschen. Das gesamte Forschungslabor zeichnete sich aus durch eine sehr enge Teamarbeit und jederzeit freundlich, nahezu familiäre Arbeitsatmosphäre.

Darüber hinaus geht mein aufrichtiger Dank an meine Freunde und ehemaligen Kommilitonen, die während ihrer Forschungsarbeiten vor ähnlichen Herausforderungen standen und durch den Austausch von Wissen und Erfahrungen mir die Fertigstellung dieser Arbeit erleichtert haben.

Zu guter Letzt möchte ich von ganzem Herzen meiner Familie danken. Ohne sie wären das Studium und diese Promotion niemals möglich gewesen.